

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Carbocyanin-markierte Derivate des Vasoaktiven Intestinalen Peptids für die Tumordiagnostik

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Sarah Bhargava
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. Schneider-Mergener
 2. Prof. Dr. Semmler
 3. Prof. Dr. Oschkinat

Datum der Promotion: 18.3.2002

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Signaltransduktion und G-Protein gekoppelte Rezeptoren	2
2.2 Rezeptoren der VIP/PACAP-Familie	4
2.3 Vasoaktives Intestinales Peptid: Struktur und Funktion	6
2.4 Tumordiagnostik mit rezeptorspezifischen Liganden	8
2.5 Aufgabenstellung	13
3. Material	14
3.1 Chemikalien	14
3.2 Aminosäuren	14
3.2.1 Fmoc-Aminosäuren für die Verwendung in der Spotsynthese	14
3.2.2 Fmoc-Aminosäuren für die Verwendung in der präparativen Synthese	14
3.2.3 Fmoc-Brompropyl-Aminosäureester	15
3.3 Cellulose und Harze	15
3.4 Carbocyaninfarbstoffe	15
3.5 Zellen	16
3.6 Geräte	16
3.7 Software	17
4. Methoden	18
4.1 Peptidsynthese auf Cellulose	18
4.1.1 Herstellung einer CAPE-Membran	19
4.1.2 Spotdefinierung	20
4.1.3 Einführung der Mercaptofunktion	20
4.1.4 Kopplung der Aminosäuren und des Cyanin-Farbstoffes	20
4.1.5 Abspaltung der Seitenschutzgruppen	21
4.1.6 Abspaltung der Peptide von der Cellulose	21
4.1.7 Quantitative Bestimmung der Beladungsdichte	22
4.2 Peptidsynthese am Polystyrolharz	22
4.3 Zellkultur	23
4.4 Durchflußzytometrie	23
4.5 Radioliganden-Bindungsstudien	25
4.5.1 Sättigungsstudien	25
4.5.2 Kompetitionsstudien	27
4.5.3 Sättigungs- und Kompetitionsstudien mit ¹²⁵ I-VIP	29

4.6 Messung der <i>in vitro</i> Stabilität	29
4.7 Messung der biologischen Aktivität.....	30
4.8 Bildgebende <i>in vivo</i> Charakterisierung	31
5. Ergebnisse	33
5.1 Spotsynthese von farbstoffmarkierten löslichen Peptidliganden	34
5.1.1 Modifikation der Cellulose.....	34
5.1.2 Modellsynthesen.....	35
5.1.3 Kopplungsausbeute der Aminosäure-Brompropylester	38
5.1.4 Stabilität der Cyaninfarbstoffe unter Spotsynthesebedingungen	39
5.1.5 Aktivierung der Farbstoffkopplung.....	40
5.2 Durchflußzytometrie als Screeningmethode für Farbstoff-Peptidkonjugate	41
5.2.1 Vorversuche	41
5.2.2 Substitutionsanalyse von VIP-Cy5(1).....	44
5.2.3 Farbstoff-Walk	48
5.2.4 Variation der Farbstoffposition beim wtVIP und [Arg ⁸]-VIP.....	49
5.2.5 Durchflußzytometrische Bestimmung ausgewählter VIP-Cy5-Konjugate	50
5.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung	51
5.3.1 Sättigungsstudien	52
5.3.2 Kompetitionsstudien.....	52
5.4 Biologische Aktivität nach Stimulation mit VIP-Cy5-Derivaten	56
5.5 Metabolische Stabilität in Rattenleberextrakt	57
5.6 <i>In vivo</i> Imaging.....	61
6. Diskussion	69
6.1 Substitutionsanalyse von VIP-Cy5(1).....	69
6.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung von VIP- und [Arg ⁸]-VIP-Konjugaten.....	79
6.3 <i>In vivo</i> Imaging von [Arg ⁸]-VIP-Cy7(1).....	81
7. Ausblick	84
8. Literaturverzeichnis.....	85
9. Abkürzungsverzeichnis	97
Erklärung.....	99

1. Zusammenfassung

Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) ist ein 28meres Neuropeptid, das eine Vielzahl biologischer Aktivitäten ausübt, welche durch die Bindung an die heptahelikalen Transmembranrezeptoren VPAC₁ und VPAC₂ vermittelt werden. VPAC₁ ist auf der Oberfläche vieler Tumorzellen überexprimiert. Daher ist VIP gekoppelt mit Signalmolekülen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen eine interessante Zielstruktur für die optische Detektion von Tumoren. Der Einsatz von VIP in der Tumordiagnostik ist jedoch aufgrund der schnellen proteolytischen Degradation stark limitiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden VIP-Analoga mit höherer *in vitro* und *in vivo* Stabilität identifiziert und synthetisiert. Hierfür wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt, welche die hochparallele Herstellung von löslichen VIP-Farbstoff-Konjugaten auf Cellulosemembranen (Spotsynthese) erlaubt. Es wurden 533 N-terminal Carbocyanin-farbstoff-markierte VIP-Analoga synthetisiert, wobei jeder VIP-Rest durch alle übrigen 19 L-Aminosäuren ausgetauscht wurde (Substitutionsanalyse). Alle Analoga wurden mittels Durchflußzytometrie hinsichtlich ihrer Bindung/Internalisierung an VPAC₁-überexprimierenden Zellen getestet. Diese Ergebnisse führten zur Identifizierung von VIP Aminosäureresten, die für die Wechselwirkung mit VPAC₁ essentiell sind und lieferten weiterhin Hinweise über eine vorwiegend helikale Struktur des Rezeptor-gebundenen VIPs. Durch Einbau des Farbstoffs an alle VIP-Reste wurden die für die Wechselwirkung mit VPAC₁ günstigen Positionen ermittelt. In Konkurrenzstudien und cAMP-Assays ausgewählter Farbstoff-markierter VIP-Konjugate wurde demonstriert, daß sowohl die Spezifität als auch die Produktion von cAMP mit Hilfe der Modifikation der Farbstoffposition gesteigert werden konnte. Für die in Rattenleber getestete metabolische Stabilität der VIP-Analoga zeigte die Farbstoffposition nur einen geringen Einfluß. Die metabolische Stabilität konnte jedoch durch eine einzige Modifikation an Position 8 (Asp⁸ → Arg⁸) erhöht werden. Weiterhin wurde das [Arg⁸]-VIP-Analogon als Kontrastmittel in *in vivo* Imaging-Experimenten mit VPAC₁-überexprimierenden Tumoren inokulierter Mäuse appliziert. Hierbei wurden die Ergebnisse der Stabilitätstests in Rattenleber bestätigt. Das N-terminal farbstoffmarkierte [Arg⁸]-VIP-Derivat zeigte gegenüber dem nativen N-terminal markierten VIP-Konjugat eine höhere Halbwertszeit *in vivo*. Darüber hinaus konnte mit [Arg⁸]-VIP ein höherer Fluoreszenzkontrast zwischen normalen und Tumorgewebe induziert werden.

2. Einleitung

2.1 Signaltransduktion und G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Funktion und Leistung von Zellen basieren auf einem komplexen Netzwerk biochemischer Prozesse, wobei jede einzelne Reaktion in einer geordneten Weise stattfindet. Zellen von höherentwickelten Lebewesen sind physikalisch durch eine Zellmembran von ihrer Umgebung abgegrenzt. Dies schafft die Voraussetzung für eine interne Regulierbarkeit chemischer Reaktionen und gewinnt damit für alle Lebensprozesse wie zum Beispiel Zellbewegung, Zellteilung, Stoffwechsel, Morphogenese sowie sensorische Vorgänge eine große Bedeutung. Die Zelle ist allerdings auf den Austausch von Wärme, Sauerstoff, Nahrungs- und Abfallstoffen sowie Informationen angewiesen. Um Informationen mit ihrer Umgebung austauschen können, müssen Zellen über einen Signalübertragungsapparat verfügen. Dieser wurde im Verlauf der Evolution durch den Einbau von Rezeptoren in die zellumgebende Membran entwickelt. Diese Rezeptoren leiten selektiv Signale in das Zellinnere weiter und lösen über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege eine biologische Antwort aus. Als Signale dienen dabei chemische Substanzen, physikalische Signale wie Licht, mechanische Kräfte, Temperaturveränderungen oder elektrochemische Impulse.

Bei der Transduktion von chemischen und physikalischen Signalen in das Zellinnere mittels membranständiger Rezeptoren unterscheidet man ionotrope Rezeptoren, transmembrane Rezeptoren mit Enzymaktivität und G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren bilden die größte Gruppe der membranständigen Rezeptoren, welche sowohl in einzelligen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* als auch bei höherentwickelten Lebewesen wie Säugern eine wichtige Rolle im Informationsaustausch spielen. In den siebziger Jahren hat die Arbeitsgruppe von Rodbell die G-Protein gekoppelten Rezeptoren entdeckt (Welton *et al.*, 1977). Seitdem wurden nahezu 2000 G-Protein gekoppelte Rezeptoren kloniert, die unterschiedlichste Liganden binden und verschiedene Zellreaktionen auslösen.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren bestehen aus einer Polypeptidkette, welche die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran siebenfach in helikaler Gestalt durchspannt. Auf diese Weise bilden sich 3 Exoloops und Cytoloops, wobei sich der N-Terminus der Polypeptidkette extrazellulär und der C-terminus intrazellulär befinden. Diese Polypeptidketten können sich bezüglich ihrer Sequenzlänge stark unterscheiden. Zum Beispiel gibt es Rezeptoren wie der Adenokortikotrophin-Rezeptor, der aus weniger als 300 Aminosäuren besteht, während andere

Rezeptoren wie metabotrope Glutamatrezeptoren mehr als 1100 Aminosäuren aufweisen. Die Längen der N- und C-terminalen Segmente können je nach Rezeptortyp variieren. Die extrazellulären Bereiche des Rezeptors sind für die Bindung des Liganden verantwortlich, während der intrazelluläre Bereich an der selektiven Bindung und Aktivierung des G-Proteins beteiligt ist. Das G-Protein ist ein trimeres GTP-bindendes Protein, welches sich aus den Untereinheiten α , β und γ zusammensetzt. Es ist im inaktiven Zustand an den Rezeptor gebunden. Über die $\beta\gamma$ -Einheit ist das G-Protein in der Zellmembran verankert, während die α -Einheit an ein GDP gebunden ist. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, geben die aktivierten G-Proteine das Signal an Effektormoleküle wie zum Beispiel Adenylatzyklasten, Phospholipasen und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen weiter. Diese wiederum lösen die Konzentrationsänderungen intrazellärer Mediatoren aus wie zum Beispiel cAMP, cGMP, Diacylglycerin, Inositoltriphosphat und Ca^{2+} aus.

Die Signalantworten, bei denen Adenylatzyklase oder Phospholipase C als Effektormoleküle dienen, sind bisher am ausführlichsten untersucht. Bei der Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle wird über ein stimulatorisches G-Protein (G_s -Protein) die Adenylatzyklase aktiviert, welche ihrerseits ATP zu 3'-5'-zyklischen AMP umsetzt. Erkennt der Rezeptor einen Liganden, bewirkt dies eine Konformationsänderung des Rezeptors und die Affinität zu GDP sinkt, so daß dieses abdissoziiert. Zytoplasmatisches GTP bindet an das stimulatorische G-Protein, welches vom Rezeptor abdissoziiert und in seine Untereinheiten α und $\beta\gamma$ zerfällt. Die α -Untereinheit ist somit frei und kann die Adenylatzyklase stimulieren. G_q -Proteine können über GDP/GTP-Austausch die Phospholipase C aktivieren. Die Phospholipase C katalysiert die Freisetzung von Diacylglycerin und Inosit-1,4,5-Trisphosphat aus Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden in Familien und Gruppen gegliedert, welche auf Homologie der Sequenzen und Ähnlichkeiten der biochemischen Eigenschaften basieren. Rezeptoren, welche gänzlich unterschiedliche Liganden binden, weisen eine Homologie von 20 - 30 % auf. Werden dieselben oder sehr ähnliche Liganden erkannt, besteht eine Sequenzhomologie von 50-80 %. Man unterscheidet sechs Familien der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wobei die Familien I, II und III ausschließlich bei höheren Lebewesen vertreten sind. Die Familien IV und V finden sich in Pilzen wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*; Familie VI umfaßt die Rezeptoren des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*.

An diese Rezeptoren können unterschiedliche Liganden wie Peptide, Glykoproteine, Lipide, Purine, Eicosanoide, Proteasen und Chemokine binden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit VPAC_1 , einem Rezeptor der Familie II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gearbeitet. Die

Familie II der Rezeptoren erkennt hauptsächlich Peptidhormone wie Glucagon, Calcitonin oder Parathormon und Neuropeptide wie das Growth Hormone Releasing Hormon. Die Rezeptoren weisen einen langen extrazellulären N-terminalen Bereich von 100 bis 170 Aminosäureresten auf, der bei der Ligandenbindung eine große Rolle spielt (Holtmann *et al.*, 1995). Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich konservierte Konsensussequenzen für N-Glykolisierungen und sechs hochkonservierte Cysteinreste (Laburthe *et al.*, 1996, Ulrich *et al.*, 1998), welche vermuten lassen, daß ein konserviertes Disulfidmuster vorliegt. Desweiteren kann eine komplexe Anordnung der Gene mit vielen Introns festgestellt werden (Laburthe *et al.*, 1999). Die Familie III der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist die bisher kleinste Familie der Rezeptoren höherer Lebewesen und schließt unter anderem die G-Protein gekoppelten Glutamaterezeptoren ein.

2.2 Rezeptoren der VIP/PACAP-Familie

Die Rezeptoren VPAC₁ und VPAC₂ gehören zu der Familie II der G-Protein gekoppelten heptahelikalen Transmembranrezeptoren und werden mit hoher Affinität von den Neuropeptiden VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid) und PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) erkannt (Gaudin *et al.*, 1998). Sie weisen die für die Familie II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren typischen Attribute auf. VPAC₁ zum Beispiel hat bei einer Gesamtlänge von 457 Aminosäuren einen sehr langen extrazellulären N-terminalen Bereich (144 Aminosäuren). In der N-terminalen Region konnten sechs konservierte Cysteinreste (Gaudin *et al.*, 1996) und zwei N-Glykosylierungsstellen als für den Rezeptortransport zur Plasmamembran als unabdingbar befunden werden (Couvineau *et al.*, 1996a). VPAC₁ wird in unterschiedlichen Geweben wie Beispiel Lunge, Leber, Nieren, Intestinaltrakt und einigen Bereichen im Hirn exprimiert (Ishihara *et al.*, 1992). VPAC₂ dagegen ist in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems, im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN), aber auch peripheralen Geweben wie Pankreas, Herz, Nieren, Hoden und Magen (Usdin *et al.*, 1994, Sheward *et al.*, 1998) präsent. Neben VPAC₁ und VPAC₂ existiert auch der Rezeptor PAC₁, welcher im Gegensatz zu den beiden anderen Rezeptoren nur PACAP und nicht VIP bindet und vorwiegend im Hirn und Nebennierenmark vorkommt.

VPAC₁ wurde 1992 erstmals aus einer Rattenlunge isoliert und kloniert (Ishihara *et al.*, 1992). Ein Jahr später erfolgte die Isolierung und Klonierung des humanen Rezeptors (Sreedharan *et al.*, 1993). VPAC₂ wurde nur kurze Zeit später aus dem Riechkolben der Ratte isoliert (Lutz *et al.*,

1993); gleiche Sequenzen konnten in der Maus und im Menschen identifiziert werden (Harmar *et al.*, 1998).

Die Klonierung der jeweiligen Rezeptoren eröffnete die Möglichkeit, die Rezeptoren im Hinblick auf ihre Struktur und Funktion eingehender zu untersuchen.

Es stellte sich heraus, daß VPAC₁ und VPAC₂ eine Homologie von ca. 50 % aufweisen und einige natürlich vorkommende VIP-verwandte Peptide wie Peptide Histidine Isoleucinamid (PHI), Peptide Histidine Valinamid (PHV), PACAP, „growth hormone releasing faktor“ (GRF) und Sekretin als Agonisten erkennen können (Couvineau *et al.*, 1996b). Die Affinitäten zwischen den verschiedenen Peptiden und VPAC₁ und VPAC₂ differieren, wobei die höchste Affinität der beiden Rezeptoren gegenüber VIP und PACAP zu beobachten ist (Tab. 1) (Gozes *et al.*, 1999a).

Humane Rezeptoren und die Rezeptoren aus der Ratte unterscheiden VIP und die Agonisten in ähnlichem Ausmaß mit der Ausnahme von PHI und Sekretin (Couvineau *et al.*, 1984). PHI zeigt eine hohe Affinität für VPAC₁ aus der Ratte (3 nM), aber eine niedrige Affinität für humanes VPAC₁ (1000 nM). Die Affinität für Sekretin ist bei humanen VPAC₁ (1500 nM) im Vergleich zu VPAC₁ aus der Ratte (300 nM) niedriger.

Agonist	VPAC₁	VPAC₂
VIP	1 nM	3-4 nM
PHI	1000 nM	10 nM
PHV	3000 nM	30 nM
PACAP-27	1 nM	10 nM
PACAP-38	1 nM	2 nM
GRF	80 nM	5000 nM
Sekretin	1500 nM	30000 nM

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten (IC₅₀) von VIP und weiteren Peptiden der VIP/PACAP-Familie zu den der humanen Rezeptoren VPAC₁ und VPAC₂

Bindet VIP an VPAC₁ oder VPAC₂ zeigt sich bei beiden Rezeptoren ein ähnliches Verhalten in der intrazellulären Zellantwort. Es konnte gezeigt werden, daß die Ligandenbindung die Aktivierung der Adenylatzyklase hervorruft, welche ihrerseits ATP in cAMP umwandelt. Daneben konnte zusätzlich der Anstieg intrazellulärer Konzentrationen von Ca²⁺ und

Inositolphosphat (Sreedharan *et al.*, 1994, Xia *et al.*, 1996, Van Rampelberg *et al.*, 1997) und die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (Lelievre *et al.*, 1998) beobachtet werden. VPAC₁ und VPAC₂ unterscheiden sich bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften und der Erkennung natürlicher Agonisten der VIP-Peptid-Familie nur wenig, obwohl sie im Gegensatz dazu bei einer Sequenzhomologie von 49 % doch sehr unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Man vermutet, daß VPAC₁ und VPAC₂ komplementäre Gewebeverteilungen aufweisen, da VPAC₂ vornehmlich in Geweben gefunden werden konnte, in denen VPAC₁ gar nicht oder in nur geringem Maße vorkommt (Usdin *et al.*, 1994). Die Gruppe um Laburthe hat Untersuchungen durchgeführt, bei denen Aminosäurepositionen, welche nur in VPAC₁ und VPAC₂ aber nicht in den sonstigen Rezeptoren der Klasse II konserviert sind, mutiert wurden. Damit konnten sie zeigen, daß für die beiden Rezeptorsubtypen unterschiedliche Aminosäurereste für die Liganden-Bindung und cAMP-Produktion essentiell sind (Nicole *et al.*, 1998). Dieselbe Gruppe hat gezeigt, daß für die Bindung von VIP die Aminosäurereste E³⁶, W⁶⁷, D⁶⁸, W⁷³ und G¹⁰⁹ von VPAC₁ entscheidend sind, welche sich um eine Höhle gruppieren, die überwiegend negativ geladen ist (Lins *et al.*, 2001).

2.3 Vasoaktives Intestinales Peptid: Struktur und Funktion

VIP wurde 1970 von Said und Mutt (Said & Mutt, 1970) aus Schweinepankreas isoliert und als eine vasodilatorische Substanz beschrieben. VIP ist ein 28meres Neuropeptid und besitzt eine große Vielfalt verschiedener biologischer Funktionen in diversen Zellen und Geweben. Es zeigte sich, daß VIP bei vielen anderen physiologischen Prozessen beteiligt ist, wie zum Beispiel bei der Bronchodilation, Immunsuppression, Hormonsekretion und auch bei der Wachstumsregulation von Föten, Tumorzellen und bei der Entwicklung des embryonalen Gehirns (Nicole *et al.*, 2000). Kürzlich konnte desweiteren bewiesen werden, daß VIP bei der Schmerzempfindung (Dickinson & Fleetwood-Walker, 1999) und Suppression von Entzündungen (Said & Dickman, 1998) eine große Rolle spielt. Und letztlich ist auch denkbar, daß VIP bei Asthma, Lungenverletzungen, Impotenz, bei einer Vielzahl von Tumoren, und neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt werden kann (Gozes *et al.*, 1999b).

VIP gehört einer großen Familie von strukturell ähnlichen Peptiden an, welche das PACAP-27 (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) und das C-terminal verlängerte PACAP-38, Sekretin, Glucagon, GLP (glucagon like peptide), GIP (gastric inhibitory peptide), GRF (growth hormone-releasing factor) und Helodermin umfaßt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	N
PACAP	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	
Helodermin	H	S	D	A	I	F	T	E	E	Y	S	K	L	L	A	K	L	A	L	Q	K	Y	L	A	S	I	L	G
PHI	H	A	D	G	V	F	T	S	D	Y	S	R	L	L	G	Q	L	S	A	K	K	Y	L	E	S	L	I	
PHV	H	A	D	G	V	F	T	S	D	F	S	K	L	L	G	Q	L	S	A	K	K	Y	L	E	S	L	M	G..
Sekretin	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	D	S	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	

Tabelle 2: Sequenzvergleich von VIP mit ausgewählten Peptide der VIP/PACAP-Familie. Die grau markierten Felder zeigen die Aminosäurepositionen, welche mit VIP übereinstimmen.

Bezogen auf Struktur und Funktion besitzen VIP und PACAP die größte Ähnlichkeit und zeigen ein Sequenzhomologie von 68 % (Tab. 2) (Vertongen *et al.*, 1997a). Kürzlich wurden NMR-Spektroskopie-Studien mehrerer Peptide der VIP/PACAP-Familie frei in Lösung durchgeführt und miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß alle Peptide dieser Familie eine reguläre Sekundärstruktur einnehmen, wobei auf eine ungeordnete N-terminale Region von 6-8 Aminosäuren, eine helikale Region von 18 ± 2 Aminosäureresten folgt, welche bei dem konservierten F⁶ oder T⁷ beginnt (Wray *et al.*, 1998). Der N-Terminus des Peptidmoleküls zeigt amphipatischen Charakter mit geladenen Aminosäureresten auf der einen Seite des Moleküls und hydrophoben Aminosäureresten auf der gegenüberliegenden Seite. Dies läßt vermuten, daß die N-terminale Region membran-bindende Eigenschaften besitzt (Wray *et al.*, 1998). Struktur-Funktions-Analysen mit VIP-Fragmenten haben gezeigt, daß die gesamte VIP-Sequenz für die biologischen Funktion nötig ist (Bodanszky *et al.*, 1973, Chadker *et al.*, 1993); lediglich das Fragment VIP₂₋₂₈ zeigte ein ähnliches Verhalten wie das Wildtyp-Peptid (Couvineau *et al.*, 1984).

In der Literatur wurden bisher eine Vielzahl verschiedener VIP-Analoga beschrieben. Hybridisierungen mit ähnlichen Peptiden wie zum Beispiel Sekretin (Vertongen *et al.*, 1997b) oder GRF (Gourlet *et al.*, 1997) führten zu selektiven VPAC₁-Agonisten. Ferner konnten auch zwei zyklische VIP-Antagonisten, Ro 25-1553 und Ro 25-1392, entwickelt werden, welche selektiv an VPAC₂ binden (Xia *et al.*, 1997).

Obwohl die Struktur-Funktions-Beziehungen von VPAC₁ und VPAC₂ weitgehend geklärt sind, bleiben die Struktur-Funktions-Beziehungen von VIP immer noch wenig verständlich. Nicole *et al.* haben vor kurzem VIP-Untersuchungen mit Hilfe von Alanin-Substitutionen und Molekularem Modelling durchgeführt (Nicole *et al.*, 2000a). Es werden 14 Aminosäuren, welche entweder für die Struktur oder Bindung zu VPAC₁ von Bedeutung sind, vorgeschlagen.

Weiterhin wurde von dieser Gruppe ein VIP-Derivat entwickelt, welches 3 Ala-Mutationen an den Positionen 11, 22 und 28 hat und selektiv an VPAC₁ bindet.

2.4 Tumordiagnostik mit rezeptorspezifischen Liganden

Die Früherkennung von Tumoren ist die wichtigste Maßnahme für die Erhöhung der Überlebensrate bei Krebspatienten. Die operative Entfernung von Primärtumoren verringert die Verbreitung des Krebses erheblich, da sich in diesem Stadium meist noch keine Metastasen in anderen Organen gebildet haben. In den letzten Jahren wurden vielversprechende Diagnoseverfahren wie zum Beispiel die Anwendung von molekularen Sonden, Mikrosatelliten oder der Einsatz von tumorspezifischen Antikörpern entwickelt (Follis *et al.*, 1994, Ballou *et al.*, 1995), um das individuelle Krebsrisiko abzuschätzen und Tumore schon im Frühstadium zu erkennen. Der Nachteil bei der Verwendung von Antikörpern liegt in dem Auftreten unerwünschter immunogener Nebeneffekte und einer zu langen Halbwertszeit im Blutplasma, welches zu niedrigen Tumor/Blut-Kontrasten während der ersten Stunden nach der Injektion führt (Goldsmith, 1997). Die Weiterentwicklung erfolgte durch die Anwendung von rekombinanten Antikörperfragmenten, welche von Neri *et al.* für die Diagnose von Gefäßen in neoplastischen Geweben entwickelt wurde (Neri *et al.*, 1997). Andere Verfahren zur Früherkennung konzentrieren sich auf Liganden, die an spezifische Rezeptoren auf Tumorzellen binden. Maligne Transformationen von Zellen führen häufig zu einer erhöhten Expression von Rezeptoren auf diesen Zellen. Liganden, welche an diese Rezeptoren binden, können an einen Marker gekoppelt werden und somit als Kontrastmittel für die Tumordiagnostik auf der molekularen Ebene eingesetzt werden. Eine hohe Affinität und Selektivität zum Rezeptor ermöglichen die Verabreichung des Liganden in einer niedrigen Dosis und erlauben zudem ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis. Zudem wirken kleine Peptide nicht immunogen und können somit die Schwächen von Antikörpern oder Antikörperfragmenten umgehen.

Derzeit werden unterschiedliche Liganden, welche spezifisch an Tumorrezeptoren binden, in diversen Laboren untersucht. Die am häufigsten in der Klinik eingesetzten Liganden sind markierte Analoga von Somatostatin, α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH), Neurotensin, Bombesin (BN), Substanz P (SP), Gastrin/Cholecystokinin und VIP (Heppeler *et al.*, 2000). Diese Peptide werden üblicherweise radioaktiv markiert und für die *in vivo* Szintigraphie und Radiotherapie untersucht. Die Rezeptorszintigraphie mit Hilfe von radioaktiv markierten Somatostatin-Analoga ist klinisch für die Detektion neuroendokriner Tumoren

etabliert (Jensen *et al.*, 1997). Es wurden einige pharmakologisch optimierte Somatostatin-Analoga mit Rezeptorsubspezifität entwickelt. Beispiele für solche Radiodiagnostika sind das Präparat OctreoscanTM, das an die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 bindet und das Präparat NeotectTM, welches an die Rezeptorsubtypen 2, 3 und 5 bindet.

VPAC₁ wird von diversen Tumorzellen wie zum Beispiel bei Adenokarzinoma, Brustkrebs, Melanoma, Neuroblastoma und gastropankreatischen Karzinoma in hoher Dichte exprimiert (Reubi, 1995), welche nach Bindung von VIP auf dem Weg der rezeptorvermittelten Endozytose in intrazelluläre Kompartimente aufgenommen werden (Luis *et al.*, 1986). Der VPAC₁-Rezeptor kann somit als System genutzt werden, um Signalmoleküle, die an VIP gebunden werden, direkt in die Tumorzelle zu transportieren. Die Gruppe von Virgolini konnte kürzlich mit Hilfe von ¹²³I-VIP als Liganden *in vivo* pankreatische und kolonische Adenokarzinome in Tumorpatienten lokalisieren (Virgolini *et al.*, 1996, Raderer *et al.*, 2000). Auch mit ⁹⁹Technetium markierten VIP konnten Tumore *in vivo* detektiert werden (Thakur *et al.*, 2000, Pallela *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß markierte VIP-Analoga oder modifizierte Varianten vielversprechende Kandidaten für die Tumordetektion *in vivo* sind. Möglicherweise lassen sich mit VIP auch Metastasen detektieren, welche bisher mit den heutigen Bildgebungsverfahren nicht entdeckt werden können. Das Gen für VPAC₁ ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 3p22 lokalisiert, bei welchem der Allelverlust mit SCLC (small cell lung cancer) und anderen Krebsarten gekoppelt ist (Maruno *et al.*, 1998). Somit wird die Annahme gestützt, daß VPAC₁ eng mit Malignität verbunden ist (Sreedharan *et al.*, 1995). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß VIP-Konjugate das Wachstum einer pankreatischen Tumorzelllinie inhibieren können (Zia *et al.*, 2000), so daß es auch denkbar wäre, VIP-Konjugate nicht nur in der Diagnostik sondern auch in der Krebstherapie einzusetzen.

Als alternatives Verfahren zur Szintigraphie hat sich in den letzten Jahren die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen mit Licht des nahinfraroten Spektralbereiches (650-1000 nm) etabliert (Beaudet *et al.*, 1998, Weissleder *et al.*, 1999, Mahmood *et al.*, 1999). Das Nahinfrarot(NIR)-Licht kann im Gegensatz zum Licht des ultravioletten und sichtbaren Spektrums tiefer in das Gewebe eindringen, da in diesem Bereich die Absorption durch körpereigene Farbstoffe, vorwiegend durch Hämoglobin und Wasser, sehr gering ist (Riefke *et al.*, 1997). Dieser Bereich der größten optischen Gewebetransparenz wird als diagnostisches Fenster bezeichnet (Abb.1).

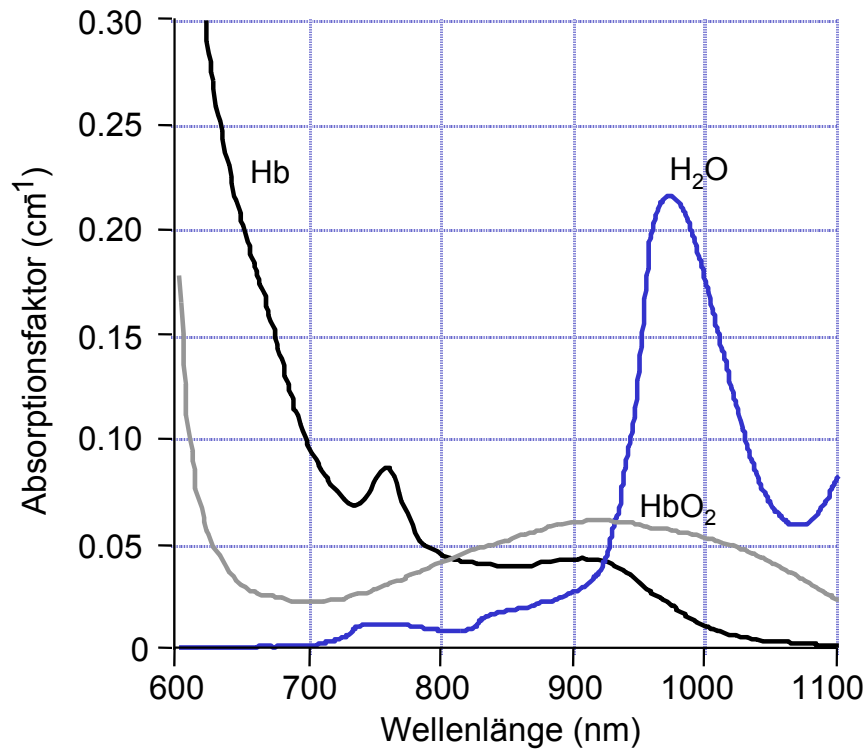


Abb. 1: Optisch-diagnostisches Fenster von Gewebe (Hb = Desoxy-Hämoglobin; HbO₂ = Oxy-Hämoglobin).

Als Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich Farbstoffe auf Basis der Cyaninstruktur. Indocarbocyanin (Cy3), Indodicarbocyanin (Cy5) und Indotricarbocyanin (Cy7) besitzen eine einzige definierte Position, die für die Kopplung an Peptide oder andere Modifikationen vorgesehen ist (Abb. 2) (Licha *et al.*, 2001). In Abhängigkeit von der Länge der Polymethinkette (3, 5 oder 7 Atome) kann ein entsprechendes Fluoreszenzemissionsmaximum von 580, 680 oder 780 nm detektiert werden, so daß je nach Detektionssystem der geeignete Farbstoff ausgewählt werden kann. Es wurden bereits Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzmarker für spezifische Biomoleküle, wie zum Beispiel Antikörper (Ballou *et al.*, 1997) verwendet und diese Konjugate im Tierversuch hinsichtlich ihrer Tumoranreicherung studiert. Die Gruppe von Weissleder hat einen Ansatz entwickelt, bei dem sich selbst quenchende Cyaninfarbstoffe an ein Trägermolekül gekoppelt werden, das von Tumorzellen internalisiert wird (Weissleder *et al.*, 1999). Tumorproteasen spalten das Molekül so, daß der Quencheffekt aufgehoben wird und das Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

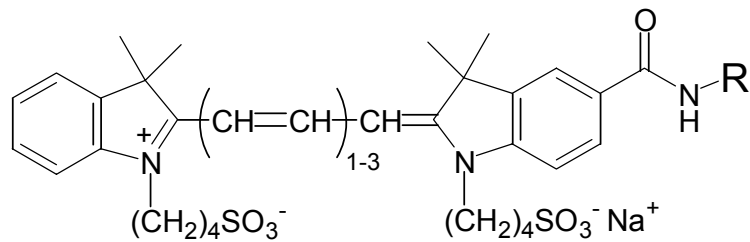


Abb. 2: Allgemeine chemische Struktur der Carbocyaninfarbstoffe, wobei an Position R weitere Moleküle wie z.B. Peptide gekoppelt werden können.

Die endoskopische Untersuchung von pathologischen Prozessen in Hohlorganen ist eine potentielle Applikation für die fluoreszenz-basierende Diagnostik. Bei epithelialen Tumoren sind die Läsionen oberflächlich lokalisiert und sind somit von der limitierten Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe nicht betroffen. Das Verfahren der Endoskopie ist bereits eine Standardmethode für die Detektion epithelialer Tumore wie zum Beispiel Tumore des Kolon, des Ösophagus oder der Blase. Tumore des Kolons, der Blase und des Ösophagus exprimieren VPAC₁ mit hoher Inzidenz (Tab. 3) (Reubi *et al.*, 1995, Reubi *et al.*, 2000). Demnach bietet die Verwendung von VIP bzw. VIP-Derivaten gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff ein mögliches Diagnoseverfahren in der fluoreszenzgestützten Endoskopie (Stepp *et al.*, 1998, Wagnieres *et al.*, 1998). VPAC₁ kann auch als molekularer Marker von Brusttumoren dienen und wäre möglicherweise mit der optischen Mammographie detektierbar. Weiterhin ist denkbar, die Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe für therapeutische Zwecke in Form der photodynamischen Therapie zu nutzen (Dougherty *et al.*, 1998).

Tumorart	VPAC ₁ -Expression	Mögliches optisches Diagnoseverfahren
Kolon	96 % (44/46)	Fluoreszenzgestützte Endoskopie
Blase	100 % (4/4)	Fluoreszenzgestützte Endoskopie
Ösophagus	100 % (4/4)	Fluoreszenzgestützte Endoskopie
Brust	100 % (39/39)	Optische Mammographie

Tabelle 3: Expressionshäufigkeit (%) von VPAC₁-Rezeptoren auf den verschiedenen Tumorzellen (Reubi, 1995 und Reubi, 1999). Die Zahlen in Klammern stellen die Anzahl der VPAC₁-rezeptorpositiven Gewebeproben (links) zu den untersuchten Gewebeproben (rechts) dar.

Die diagnostische Anwendung von VIP als Kontrastmittel ist stark limitiert, da VIP eine kurze Halbwertszeit *in vivo* zeigt. Die kurze Halbwertszeit wird durch einen schnellen proteolytischen Abbau des Peptides bedingt (Domschke *et al.*, 1978, Keltz *et al.*, 1980, Hassenius *et al.*, 2000). Deshalb ist es also notwendig, in Analogie zu den Somatostatin-bindenden Peptiden, strukturoptimierte VIP-Konjugate zu entwickeln, die eine für die Dauer des Diagnosevorganges genügend hohe Stabilität gegenüber dem proteolytischen Abbau aufweisen.

2.5 Aufgabenstellung

Der VIP-bindende Rezeptor VPAC₁ wird von Tumorzellen in hoher Dichte exprimiert, so daß VIP gekoppelt mit einem Signalpeptid potentiell für die Verwendung als Kontrastmittel in der rezeptorvermittelten Tumordiagnostik verwendet werden kann. Die optische Bildgebung von Tumoren ist aufgrund der schnellen proteolytischen Degradation von VIP *in vivo* begrenzt und bedarf strukturell optimierter VIP-Derivate mit höherer Stabilität.

Aufgabe dieser Arbeit war die Entwicklung stabiler VIP-Analoga, welche für die Bildgebung im Nahinfrarot-Bereich mit Carbocyaninfarbstoffen markiert werden sollten. Hierfür war die Etablierung eines Zellassays vorgesehen, bei dem lösliche markierte VIP-Derivate mittels Spotsynthese hergestellt und bezüglich ihrer Bindung/Internalisierung an VPAC₁-überexprimierende Zellen mit den Methoden der Durchflußzytometrie getestet werden sollten. Zuerst sollte für die Spotsynthese der VIP-Farbstoff-Konjugate eine Synthesestrategie entwickelt werden, welche die Abspaltung der Peptide mit authentischen C-Termini von der Zellulose ermöglicht. Zu diesem Zweck sollte die Spotsynthese hinsichtlich der Farbstoffkopplung optimiert werden. Für die Untersuchung der Rezeptor-Liganden-Interaktion sollte dann diese Technik genutzt werden, um eine vollständige Substitutionsanalyse des VIP anzufertigen. Weiterhin sollten ausgewählte VIP-Farbstoff-Konjugate eingehender *in vitro* charakterisiert werden. Die Charakterisierung der VIP-Farbstoff-Derivate beinhaltete die Untersuchung der Spezifität mit radioaktiven Kompetitionsstudien, die Testung der biologischen Aktivität im cAMP-Assay und die Überprüfung der Stabilität in Rattenleberhomogenat. Abschließend sollte die Verwendung farbstoffmarkierter VIP-Derivate in der Tumordiagnostik mit Hilfe von *in vivo* Imagingversuchen am Tiermodell überprüft werden. Für die Tierversuche sollten Nacktmäuse mit inokulierten VPAC₁-überexprimierenden Tumoren verwendet werden.

3. Material

3.1 Chemikalien

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Chemikalien und Reagenzien, die nicht von diesen Firmen stammen, werden mit Herstellernachweis im Methodenteil gesondert aufgeführt. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen und Medien wurden von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen. Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem Wasser (Filteranlage von Millipore) angesetzt.

3.2 Aminosäuren

3.2.1 Fmoc-Aminosäuren für die Verwendung in der Spotsynthese

Es wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren der Firmen NovaBiochem (Schweiz) und Bachem (Heidelberg) verwendet.

Der Großteil der Aminosäuren lag bereits als aktivierter Pentafluorphenyl(Pfp)- oder 3-Hydroxyl-2,3-dihydro-4-oxo-benzotriazin(Dhbt)- Ester vor; nicht aktivierte Aminosäuren wurden mit einem Äquivalent HoAt und zwei Äquivalenten DIC *in situ* aktiviert. Die Aktivester der Aminosäuren konnten als Lösung in NMP bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu drei Wochen aufbewahrt werden. Eine Ausnahme davon war der Aktivester von Arginin, welcher wegen der niedrigen Stabilität vor der Verwendung frisch hergestellt wurde.

3.2.2 Fmoc-Aminosäuren für die Verwendung in der präparativen Synthese

Bei der Synthese von Peptiden an Polystyrolharz wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren von NovaBiochem (Schweiz) verwendet. Diese Aminosäure-Derivate besaßen freie C-Termini und wurden *in situ* mit PyBOP und NMM aktiviert.

Die Fmoc-geschützten Aminosäuren sowohl für die Spotsynthese als auch die präparative Synthese am Polystyrolharz hatten folgende Seitenschutzgruppen: Triphenylmethyl (Trt) bei Cystein, Histidin, Asparagin und Glutamin, tert. Butyl (tBu) bei Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin und Tyrosin, tert. Butoxycarbonyl (Boc), Methoxytrityl (Mmt) oder Alloc bei Lysin, tert. Butoxycarbonyl (Boc) bei Tryptophan und Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) bei Arginin.

3.2.3 Fmoc-Brompropyl-Aminosäureester

Es wurden Fmoc-3-Brompropyl-Aminosäureester verwendet, welche in der AG Schneider-Mergener hergestellt wurden.

3.3 Cellulose und Harze

Als Cellulosemembrane wurden Whatman[®]50-Filterpapiere der Firma Whatman (Maidstone, England) verwendet. Für die Synthese der Peptide am Harz wurde Polystyrolharz Tenta Gel SRAM mit einer Kapazität von 0,25 mmol/g der Firma Rapp Polymere (Tübingen) eingesetzt.

3.4 Carbocyaninfarbstoffe

Es wurden die Farbstoffe Indodicarbocyanin (Cy5) und Indotricarbocyanin (Cy7) verwendet, welche freundlicherweise von Dr. Kai Licha vom Institut für Diagnostikforschung der FU Berlin zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurden für die durchflußzytometrischen Messungen Cy5 und für die Vorversuche der Spotsynthese und *In vivo*-Imaging-Experimente Cy7 an die entsprechenden Peptide gekoppelt.

3.5 Zellen

Aus der Arbeitsgruppe Gastroenterologie und Hepatologie der Charité Berlin von Prof. Dr. Wiedenmann und Dr. Carsten Grötzinger wurden freundlicherweise RIN38(VPAC₁)-Zellen zur Verfügung gestellt. Bei diesen RIN38-Zellen (Poitot *et al.*, 1996) handelt es sich um Insulin-sekretierende Zellen aus dem Pankreas, welche so transfiziert wurden, daß der Rezeptor VPAC₁ in Fusion mit eGFP (Kendall & Badminton, 1998) überexprimiert ist.

Zusätzlich wurde die VPAC₁-überexprimierende Zelllinie HT-29 (Couvineau *et al.*, 1985) von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) (No. ACC 299) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane Adenokarzinomazelllinie, welche aus Primärtumoren im Kolon einer 44-jährigen Frau isoliert wurde.

3.6 Geräte

Analysenwaage Satorius basic	Satorius, Göttingen
Analytische HPLC:	
Waters 66E System Controller	
Waters 991 Photodiode Array Detector	
Waters 470 Scanning Fluorescence Detector	
Waters 717 plus Autosampler	
Pumpe	Waters, Eschborn
Vydac HPLC-Säulen	Sep/a/ra/tions Group, USA
Auto-Spot Robot ASP 222 XL	Abimed, Langenfeld
CCD-Kamera ICCD-576G-E	Princeton Instruments Inc., USA
FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Gammacounter Compugamma 1282	LKB Wallac, USA
LaserTec Benchtop II	PerSeptive Biosystems, USA
Lyophilisator Lyovac GT 2/GT 2-E	Finn-Aqua, München

Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
MultiScreen Vakuums-Filtrationssystem	Millipore, USA
MultiScreen Stanze	Millipore, USA
Multipler Peptidsynthesizer AMS 422	Abimed, Langenfeld
pH-Meter GC 840	Schott Geräte, Hofheim
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, USA
Präparative HPLC:	
Waters 486 Tunable Absorbance Detector	
Waters 625 LC Systems	
Pumpe	Waters, Eschborn
Vydac HPLC-Säulen	Sep/a/ra/tions Group, USA
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg,
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Berlin

3.7 Software

CELLQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
ChemDraw	CambridgeSoft Corporation, USA
Corel Draw 8.0	Corel Corporation, Kanada
Excel 5.0	Microsoft, USA
PRISM 3.0	GraphPad Software, USA
LISA	Jerini Bio Tools GmbH, Berlin
Winview 1.6.2	Princeton Instruments Inc., USA

4. Methoden

4.1 Peptidsynthese auf Cellulose

Der Syntheseablauf von Peptiden auf Cellulose mit Hilfe der Fmoc-Strategie ist in Abb. 4.1 dargestellt.

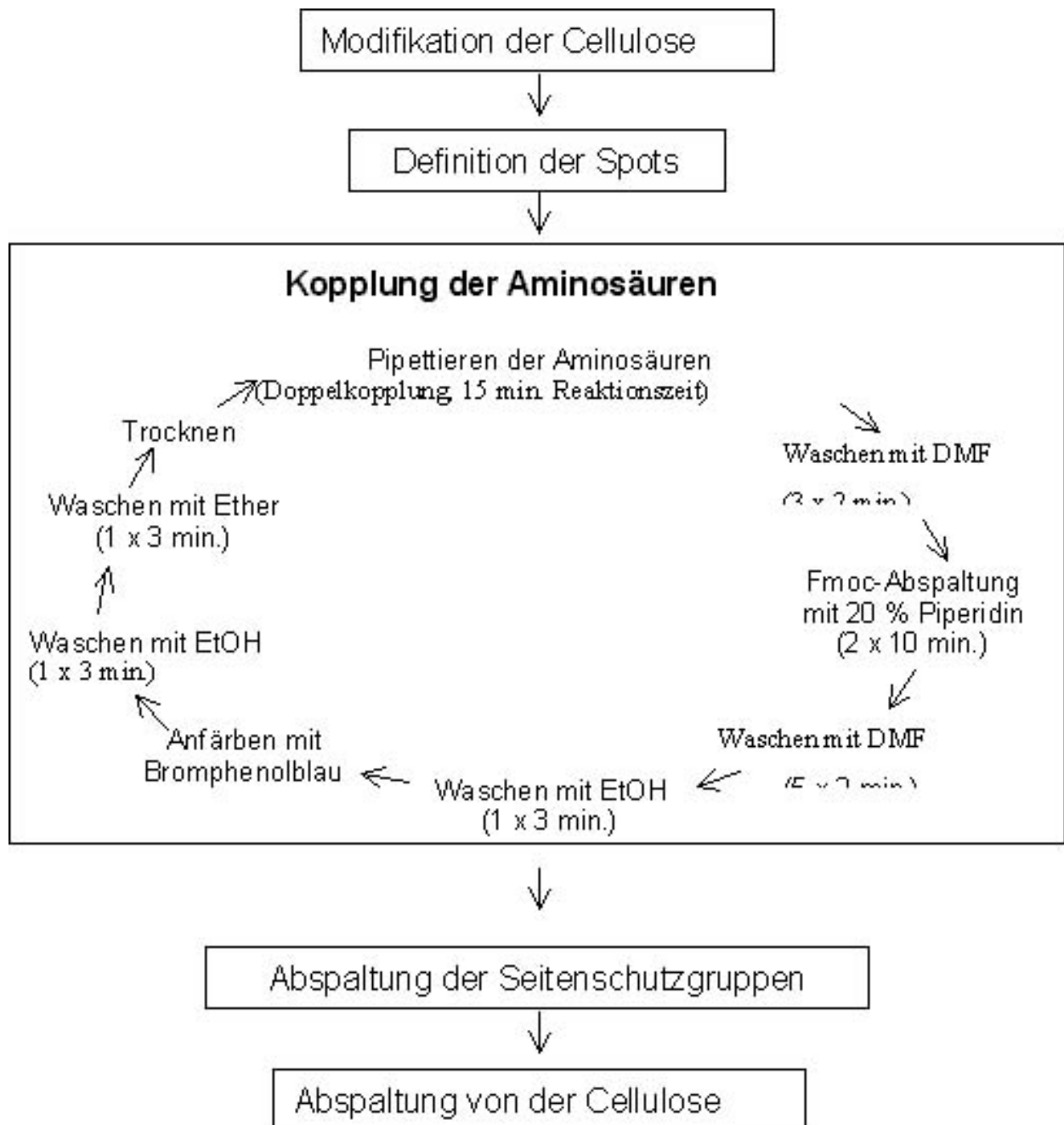


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Peptidsynthese an Cellulosemembranen

Für die Spotsynthese an Cellulose wurde eine mercaptofunktionalisierte Membran hergestellt, an welcher die erste Aminosäure in Form eines Fmoc-Aminosäure-Brompropylesters gekoppelt wurde (Licha *et. al.*, 2000a). Auf diese Weise konnten nach Beendigung der Synthese die einzelnen Peptide, als Peptide mit authentischen C-Termini, mit einer milden Base von der Cellulose abgelöst werden. Es wurde zuerst eine CAPE-Membran („cellulose-amino-hydroxyl-propylether“) hergestellt (Volkmer-Engert *et al.*, 1997), eine aminofunktionalisierte Membran, auf der mit β -Alanin die Syntheseorte als Punkte („Spots“) definiert wurden. Um die reaktiven Reste auf diese „Spots“ zu begrenzen, wurde der restliche Bereich der Membran durch Acetylierung blockiert. Die Mercaptofunktion wurde mit Hilfe von Mercaptopropionsäure aufgebracht und nach Aktivierung mit Cäsiumcarbonat konnten die Brompropionsäureester gekoppelt werden

Anschließend wurden alle weiteren Aminosäuren des Peptids sukzessive nach der Fmoc-Strategie in einem fortlaufenden Zyklus (Abb. 4.2) aufgebaut. Nach Beendigung der Synthese wurden die Seitenschutzgruppen abgespalten.

4.1.1 Herstellung einer CAPE-Membran

- Eine 20 x 30 cm große Whatman 50-Cellulosemembran wurde für 2 min. in 1,2 % Perchlorsäure in Methanol gelegt. Anschließend wurde die Lösung abgegossen.
- Nachdem die Membran getrocknet war, wurde sie für 2 Stunden mit 1,2 % Perchlorsäure, 10 % Epibromhydrin in Dioxan inkubiert. Um überschüssiges Epibromhydrin abreagieren zu lassen, wurden 100 ml Methanol hinzugefügt. Es folgten zwei Waschschrte mit Methanol und 3 Waschschrte mit DMF.
- Für das Anbringen einer Aminofunktion wurde die Membran über Nacht mit 50 % 1,3-Diaminopropan in DMF inkubiert. Anschließend wurde wie folgt gewaschen: 3 x DMF, 2 x EtOH, 2 x *aq. bidest*, 2 x EtOH.
- Zur Beseitigung restlicher Bromfunktionalitäten wurde die Membran 20 min. mit 30 %iger Natriummethanolat-Lösung inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte: 3 x MeOH, 4 *aq. bidest*, 3 x EtOH, 1 x Diethylether. Anschließend wurde die Membran getrocknet.

4.1.2 Spotdefinierung

- Mit Hilfe des Auto-Spot Robot 222 XL (Abimed, Langenfeld) wurde 0,6 M β -Alaninlösung in DMSO auf die Membran pipettiert. Es wurden Doppelkopplungen bei einer Reaktionszeit von 15 min. durchgeführt.
- Die Membran wurde 3 min. mit 2 % Acetanhydrid in DMF und 30 min. mit 2 % Acetanhydrid, 1 % DIPA in DMF acetyliert.
- Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des veresterten β -Alanins wurde die Membran zunächst 3 x mit DMF gewaschen und anschließend 2 x 10 min. mit 20 % Piperidin in DMF inkubiert. Es folgte 5 x Waschen mit DMF, 2 x mit EtOH, Färben der freien Aminogruppen mit BPB-Lösung, 1 x Waschen mit EtOH und 1 x Waschen mit Diethylether und Trocknen der Membran.

4.1.3 Einführung der Mercaptofunktion

- Es wurde 0,6 M Mercaptopropionsäure, welche zuvor mit einem Äquivalent HATU und zwei Äquivalenten NMI aktiviert wurde, gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen jeweils mit DMF und DCM wurde die Membran getrocknet.
- Für die Beseitigung der Mmt-Schutzgruppe von der Mercaptopropionsäure wurde die Membran mit 10 % Dichloressigsäure, 0,05 % TFA in DCM inkubiert, bis die „Spots“ sich orange färbten. Danach wurde solange mit 10 % Dichloressigsäure, 0,05 % TFA, 5 % TIBS in DCM gewaschen, bis die Farbe vollständig verschwunden war. Anschließend wurde 1 x mit DCM, 2 x mit EtOH, 1 x mit *aq. bidest* gewaschen. Die Aktivierung der Mercaptofunktion erfolgte durch Inkubation mit 10 % Cäsiumcarbonatlösung für 1-2-min. Es wurde weiterhin 1 x mit *aq. bidest*, 2 x mit EtOH und 1 x mit Ether gewaschen.

4.1.4 Kopplung der Aminosäuren und des Cyanin-Farbstoffes

Die ersten Aminosäuren des Peptids wurden als 0,6 M Fmoc-Aminosäure-Brompropionester in DMF auf die Membran gebracht. Der Rest des Peptids wurde durch wiederholtes Aufpipettieren

von 0,6 M Aminosäurelösungen in NMP auf die „Spots“ und anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen (siehe 4.1.2) aufgebaut.

Nach Beendigung der Synthese wurde 0,3 M Indodicarbocyanin-Lösung mit einem Äquivalent TBTU und zwei Äquivalenten DIPA N-terminal an das Peptid gekoppelt.

Die Kopplung des Cyaninfarbstoffes an das C-terminale Ende oder in die Mitte der Sequenz erfolgte an ein Lysin mit einer Mmt-Schutzgruppe. Dafür wurde die letzte Aminosäure am N-terminalen Ende als eine Boc-geschützte Aminosäure gekoppelt. Die Mmt-Schutzgruppe des Lysins konnte mit 3 % TFA in DCM entfernt werden und mit 3 % TFA und 5 % TIPS in DCM abgefangen werden.

4.1.5 Abspaltung der Seitenschutzgruppen

Die Abspaltung der Seitenschutzgruppen erfolgte durch nacheinanderfolgende Behandlung der Membran mit 90 % TFA, 3 % TIBS, 2 % *aq. bidest*, 1 % Phenol in DCM für 30 min. und 50 % TFA, 3 % TIBS, 2 % *aq. bidest*, 1 % Phenol in DCM für 2,5 h. Anschließend wurde die Membran 4 x mit DCM, 3 x mit DMF und 2 x EtOH gewaschen und getrocknet.

4.1.6 Abspaltung der Peptide von der Cellulose

Die einzelnen „Spots“ wurden aus der Membran ausgestanzt und in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen mit 0,16 M NaOH-Lösung in Acetonitril/*aq. bidest* (2/1) (v/v) für 30 min. inkubiert. Zur Neutralisierung wurde mit einer Endkonzentration von 2 % Salzsäure zugefügt. Nach Entfernen der 'Spots' wurden die Peptidlösungen in der SpeedVac eingedampft und anschließend in *aq. bidest* wieder aufgenommen.

Um die Vollständigkeit der Synthese und den Reinheitsgrad der Peptide zu überprüfen, wurden einige Peptide mittels „reversed phase“-HPLC und Laserdesorptions-Flugzeitmassen-spekrometrie (MALDI-TOF) untersucht. Es wurde ein linearer Gradient 20 % bis 60 % Acetonitril/0,05 % TFA gegen Wasser/0,05 % TFA in 30 min. verwendet. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214 nm und der Wellenlänge des entsprechenden verwendeten Cyaninfarbstoffes.

4.1.7 Quantitative Bestimmung der Beladungsdichte

Die analytische Kontrolle über die Beladungsdichte der Membran kann über die Quantifizierung der Fmoc-Schutzgruppe eines Spots erfolgen. Dafür wurde ein einzelner Spot ausgestanzt und mit 1,01 ml 20 %iger Piperidinlösung inkubiert. Nach 20 min. wurde die Fmoc-Schutzgruppe photometrisch bei 302 nm detektiert. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Extinktionskoeffizient = $8100 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde die Stoffmenge eines Peptids pro Spot berechnet.

4.2 Peptidsynthese am Polystyrolharz

Die Synthese von löslichen Peptiden wurde mit Hilfe eines Multiplen Peptidsynthesizers (MPS) durchgeführt. Es wurden Ansätze von 50 μmol TentaGel SRAM hergestellt. Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Ein Synthesesyklus des Automaten bestand aus der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF für zweimal 15 min. und einer darauffolgenden sechsmaligen Waschprozedur mit DMF. Anschließend wurden die Aminosäuren mit einem Äquivalent PyBOP und zwei Äquivalenten NMM aktiviert und zweimal 15 min. gekoppelt. Danach wurde 6 x mit DMF gewaschen. Für die Kopplung des Cyaninfarbstoffes an das N-terminale Ende des Peptids wurde nach Beendigung der Synthese der Cyaninfarbstoff wie bei der Synthese auf Cellulose aktiviert und im 1,5 fachen Überschuß auf den Polystyrolharz gegeben. Bei der Kopplung des Cyaninfarbstoffes an ein Alloc-geschütztes Lysin in der Sequenzmitte mußte das N-terminale Ende zuerst wieder mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen werden, indem für 2 Stunden mit 200 μM Fmoc-O-Succinimidylester in DMF inkubiert wurde. Die Alloc-Schutzgruppe des Lysins wurde mit 5 %igem N-Methylanilin und einer Spatelspitze Tetrakis(triphenylphosphin)palladium in DCM entfernt. Anschließend konnte der Cyaninfarbstoff wie oben beschrieben gekoppelt werden.

Die Abspaltung der Peptide vom Polystyrolharz und der Seitenschutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit 5 % Methylphenylsulfid, 5 % *aq. bidest*, 2,5 % EDT, 7,5 % (w/v) Phenol in TFA 3 h lang. Im Anschluß wurden die Peptide in eiskaltem tert. Butylmethylether ausgefällt und 2 min. bei 3200 rpm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde 3 x mit Diethylether gewaschen und abzentrifugiert (2 x 2 min. bei 3200 rpm, 1 x 6 min. bei 5800 rpm). Die trockenen Peptide wurden in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und lyophilisiert.

Wie bei den Cellulosepeptiden wurde hier ebenfalls der Reinheitsgrad mittels „reversed phase“-HPLC und MALDI-TOF untersucht und, wenn nötig, wurden die Peptide mit der präparativen HPLC gereinigt.

4.3 Zellkultur

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurde routinemäßig in McCoy-Medium, welches mit 10 %igen fötalem Kälberserum versetzt wurde, kultiviert, während für die RIN38-Zellen RPMI 1640-Medium verwendet wurde. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt; alle 2 Tage wurde das Kulturmedium zu 50 % ausgetauscht.

Zur Herstellung von Subkulturen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 5 min. mit 0,25 % in PBS bei 37 °C inkubiert. Mittels Abklopfen oder mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Kulturflasche gelöst, in Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspensionen wurden mit Medium verdünnt und erneut in Zellkulturflaschen ausplattiert.

4.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur statistischen Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften (Carter *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde ein FACS (fluorescence activated cell sorting)-Gerät der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet, welches Zellen analysiert und aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften sortiert.

In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluß einer Trägerflüssigkeit, in welcher die zu messende Zellsuspension eingebracht wird. Durch die höhere Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzeln die Zellen und werden auf diese Weise fixiert an einem Laserlicht vorbeigeführt. Der Laser führt zur Excitation der Fluoreszenzfarbstoffe, welche wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die Fluoreszenz kann durch exprimierte Proteine wie z.B. GFP, angefärbte Zellbestandteile oder markierte Antikörper hervorgerufen werden. Die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften, aber auch wegen morphologischer Zellparameter unterschieden werden. Die Vorwärtsstreuung (FSC= forward scatter) wird von der Größe der

Zelle bestimmt, während die Seitwärtsstreuung (SCC = side scatter) die Granularität der Zelle bezeichnet (Abb. 3.3). Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und zur Auswertung auf einen Computer übertragen.

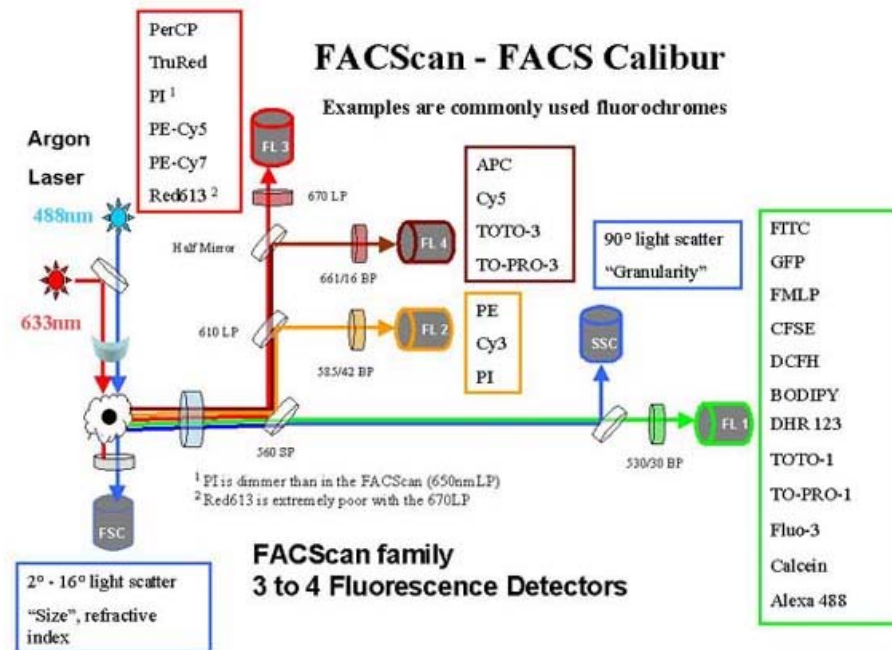


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des FACS-Calibur-Gerätes (Beckton-Dickinson) mit der Auflistung der detektierbaren Farbstofftypen. Neben der Messung der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC, SSC) können 4 verschiedene Fluoreszenz-Parameter (FL1-4) detektiert werden.

Für die durchflußzytometrischen Studien von VIP/VPAC₁ wurden 10⁵ RIN38(VAC₁)-Zellen pro Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 3 Tage lang in Medium kultiviert. Vor Inkubation mit farbstoffmarkierten VIP-Konjugaten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die mit Farbstoff markierten Testsubstanzen wurden mit einer Endkonzentration von 150 nM eingesetzt, wobei die Konzentration photometrisch bei der entsprechenden Wellenlänge des jeweiligen Cyaninfarbstoffes und Extinktionskoeffizienten ermittelt wurde.

Die VIP-Derivate wurden 1 h bei 37 °C in Bindungspuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 0,2 % BSA in *aq. bidest*) in Dreifachansätzen mit den Zellen inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde den Zellansätzen jeweils 100 µl 0,25 % Trypsin in PBS zugefügt und 2 min. auf Eis inkubiert. Die Trypsin-Lösung wurde abgegossen und die Mikrotiterplatten wurden weitere 5 – 10 min. auf Eis stehen gelassen, so daß sich die Zellen lösen konnten. Die Wirkung des Trypsins wurde mit 100 µl 10% FCS in PBS gestoppt. Die

Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen überführt und 5 min. bei 377 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in eiskalter Cellfix-Lösung (Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert.

Die Fluoreszenz-Messung erfolgte am FACS-Calibur bei 633 nm mittels eines Helium-Neon-Lasers, wobei die Fluoreszenzdaten mit dem Programm CELL Quest berechnet wurden.

4.5 Radioliganden-Bindungsstudien

Um die Anzahl von Rezeptoren und deren Bindungsverhalten gegenüber Liganden zu bestimmen werden Bindungsstudien durchgeführt. Als Liganden werden radioaktiv markierte Antagonisten verwendet, welche spezifisch an den Rezeptor binden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Bindungsstudien mit ^{125}I -VIP (Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Man unterscheidet zwei Arten von Bindungsstudien: Sättigungsstudien und Konkurrenzstudien.

4.5.1 Sättigungsstudien

Sättigungsstudien werden überwiegend zur Bestimmung der Rezeptorkonzentration verwendet. Dabei werden zu einer definierten Menge Rezeptor ansteigende Konzentrationen des Liganden zugefügt. Nach einer Inkubationszeit wird die Reaktion mittels Filtration gestoppt. Der ungebundene Ligand wird ausgewaschen, während der gebundene Ligand auf dem Filter bleibt und im Gammacounter gemessen werden kann.

Man unterscheidet zwischen der spezifischen und unspezifischen Ligandenbindung. Bei der spezifischen Bindung bindet der Ligand ausschließlich an den Rezeptor, während er bei der unspezifischen Bindung auch anderweitig an unspezifische Membranstrukturen bindet. Die unspezifische Bindung folgt einem linearen Verlauf. Zusammen mit der spezifischen Bindung stellt sie die totale Bindung dar (Abb. 4.3).



Abb. 4.3: Darstellung der spezifischen Bindung

In Abbildung 4.3 kann man sehen, daß die unspezifische Bindung dafür verantwortlich ist, daß die totale Bindung keine Sättigung erreicht. Deshalb wird bei weiteren Berechnungen die spezifische Bindung verwendet, welches die experimentelle Bestimmung der unspezifischen Bindung voraussetzt.

Der Scatchard-Plot ist ein Verfahren zur Linearisierung von Bindungsdaten. Er basiert auf dem Verfahren von Eady und Hofstee (Hofstee et al., 1952) aus der Enzymkinetik und dem von Scatchard (Scatchard, 1949) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen. Dabei gibt man zu einer definierten Menge Rezeptor zunehmende Konzentrationen des Liganden. Im einfachsten Fall unterliegt die Bindung vom Liganden zum Rezeptor dem Bindungsmechanismus I, wobei ein Ligand an einen Rezeptor bindet.

Dem Scatchard-Plot liegt der folgenden Gleichung zugrunde:

$$\frac{B}{L} = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad \text{Gl.1}$$

- B = Konzentration an sättigbar gebundenem bzw. spezifischem Liganden
- B_{\max} = maximal erreichbare Konzentration an sättigbar gebundenem Liganden
- L = Konzentration des freien Liganden
- K_D = Dissoziationskonstante des Liganden am Rezeptor

Den Scatchard-Plot erhält man durch die Auftragung der Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden (B) am Rezeptor gegen den Quotienten von spezifisch gebundenem und freien Liganden (B/L) (Abb. 4.4).

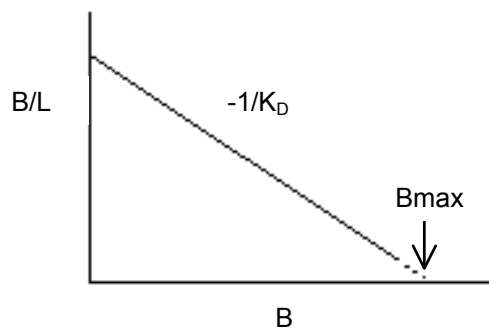


Abb. 4.4: Scatchard-Plot zur Bestimmung der maximalen Rezeptorbindungsstellen B_{\max} und der Dissoziationskonstante K_D

Die Neigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ($-1/K_D$). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abzisse entspricht der Menge an maximalen Rezeptorbindungsstellen.

4.5.2 Wettbewerbsstudien

Wettbewerbsstudien werden überwiegend zur Klassifizierung von Rezeptorsubtypen und zur Testung von verschiedenen Antagonisten oder Agonisten eingesetzt. Dabei wird eine bestimmte Menge Rezeptor mit einer konstant bleibenden Menge des Radioliganden inkubiert. Der Radioligand wird in demselben Ansatz durch unterschiedliche Konzentrationen von nicht markierten Liganden verdrängt. Wie bei den Sättigungsstudien werden der gebundene und der nichtgebundene Ligand mittels Filtration voneinander getrennt und der gebundene Ligand am Gammacounter gemessen.

Bildet man die Quotienten aus der Bindung (B_i) und der Totalbindung (B_0) B_i/B_0 und trägt diesen gegen die Konzentration des kompetitierenden Liganden bzw. Inhibitor auf (Abb. 4.5), lässt sich die Konzentration des Inhibitors (IC_{50}) ermitteln, bei der 50 % des Liganden am Rezeptor verdrängt wurde.

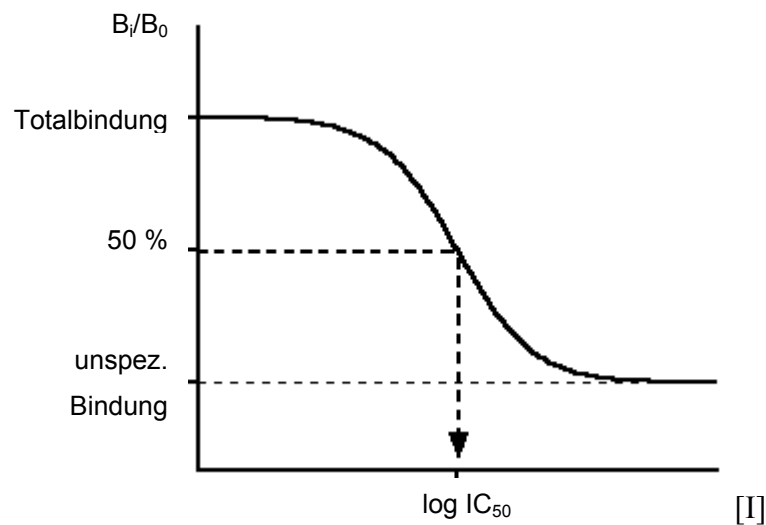


Abb. 4.5: Kompetitive Bindungskurve zur Ermittlung der IC_{50}

Mit Hilfe der Dissoziationskonstante des Liganden (K_D) und der IC_{50} kann man anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng & Prusoff, 1973)(Gl.2) die Dissoziationskonstante des Inhibitors einfach berechnet werden.

$$K_i = \frac{K_D \times IC_{50}}{L_0 + K_D} \quad \text{Gl. 2}$$

IC_{50} = Konzentration des Inhibitors, bei der 50 % eines am Rezeptor gebundenen Liganden verdrängt wird

L = Konzentration des Radioliganden

K_D = Dissoziationskonstante des Liganden am Rezeptor

K_i = Dissoziationskonstante des Inhibitors am Rezeptor

Die Cheng-Prusoff-Gleichung ist nur bei einfachen Verdrängungsmechanismen anwendbar. Bei komplizierteren Mechanismen, oder wenn der Inhibitor an mehreren Stellen bindet, erhält man mehrere Konstanten, die sich zu einer scheinbaren K_i zusammensetzen.

4.5.3 Sättigungs- und Kompetitionsstudien mit ^{125}I -VIP

Im Bindungstest wurden 10^5 vorgekühlte RIN38(VAC₁)-Zellen in 200 μl Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 0,2 % BSA, pH 7,7) in MultiScreen-Filtrationsplatten (HV 0,45 μM) (Millipore, Bedford) gegeben. Bei diesen MultiScreen-Filtrationsplatten handelt es sich um 96-Well-Platten, welche am Boden einen Filter haben, wodurch mittels Vakuum Lösungen wie Puffer, Medium etc. von Zellen getrennt werden können. Steigende Konzentrationen ^{125}I -VIP der Firma Amersham (Braunschweig) wurden zu den Zellen hinzugefügt und in Abwesenheit (Totalbindung) und Anwesenheit (unspezifische Bindung) von 1 μM unmarkiertem VIP inkubiert. Für den Liganden wurde hierbei ein Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 20 nM gewählt. Nach einer Stunde bei 4 °C wurde bei den jeweiligen Tests der ungebundene Ligand mit Hilfe der MultiScreen Vakuums-Filtration (Millipore, Bedford) von gebundenem Liganden separiert. Die Zellen wurden gewaschen, indem 3 x Bindungspuffer durch die Filtrationsplatten gesaugt wurde. Anschließend wurden MultiScreen-Einwegstempel (Millipore, Bedford) auf die Filtrationsplatten gesetzt und die Filter mit Hilfe der MultiScreen Stanze (Millipore, Bedford) ausgestanzt. Die Filter wurden in geeigneten Röhrchen aufgefangen und im automatischen Gammazähler gemessen. Die Affinität des Liganden (K_D) und die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) wurden über den Scatchard-Plot mit dem Programm PRISM 3.0 ermittelt.

Im Verdrängungstest wurden 10^5 vorgekühlte RIN38(VAC₁)-Zellen in 200 μl Bindungspuffer mit 0,1 nM ^{125}I -VIP in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der VIP-Derivate für 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Waschen und Ausstanzen der Filter erfolgte wie beim Bindungstest (siehe oben). Die Berechnung der Konzentration des VIP-Derivates, bei der die Bindung des markierten Liganden auf die Hälfte reduziert (IC_{50}) wird, und die Dissoziationskonstante des VIP-Derivates (K_i) wurde über die Cheng-Prusoff-Gleichung mit dem PRISM 3.0-Programm bestimmt.

4.6 Messung der *in vitro* Stabilität

Für die Untersuchung der Stabilität farbstoffmarkierter Peptide wurde ein *in vitro* Testsystem etabliert, das eine Inkubation der Verbindungen in einem enzymatischen Cocktail und deren anschließende Analyse mittels HPLC erlaubt. Zur Gewinnung eines geeigneten Inkubationsmediums wurde homogenisierte Rattenleber extrahiert.

5 g Rattenleber wurden in 0,25 M Sucrose, 5 mM HEPES, 10 mM EDTA mit einem Ultraturrax auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde bei 40000 rpm (AF80-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung mit einem Bio-Rad Protein Assay KIT #1 (Bio-Rad, USA) verwendet. Hierfür wurden mit einem BSA-Standard (Pierce, USA) Standardkonzentrationen zwischen 0,5 und 30 µg BSA hergestellt, welche im Verhältnis 5:1 mit dem Farbreagenz versetzt wurden. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei RT wurden die Proben bei 595 nm am Photometer gemessen und eine Standardreihe erstellt. Das Leberextrakt wurde 1:1000 verdünnt, ebenfalls mit Farbreagenz vermischt und photometrisch gemessen. Es konnte eine Proteinkonzentration von 9,12 mg/ml ermittelt werden.

Für die Messung der Stabilität von VIP-Derivaten wurden 125 µM der jeweiligen Derivate in der Leberextraktlösung bei 37 °C gehalten, zu unterschiedlichen Zeiten 100 µl abgenommen und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Kontrolle wurden die VIP-Derivate in PBS bei 37 °C gehalten, ebenfalls 100 µl zu unterschiedlichen Zeiten abgenommen und eingefroren. Die abgenommenen Proben wurden jeweils mit einem linearen Gradienten bei 25 % bis 95 % Methanol in 30 min. mit Hilfe der HPLC analysiert. Der Gehalt der Ausgangssubstanz wurde bestimmt und als prozentualer Anteil im Gesamtgemisch ermittelt.

4.7 Messung der biologischen Aktivität

Die Bindung von VIP an den entsprechenden Rezeptor bewirkt die Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase, welche ihrerseits Adenosintriphosphat in zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat umwandelt (Laburthe *et al.*, 1978). Um die biologische Aktivität der synthetisierten Farbstoffkonjugate im Vergleich zu nativem VIP zu überprüfen, wurde die Produktion von cAMP an der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 gemessen (Muller *et al.*, 1985). Dabei entspricht eine hohe cAMP-Konzentration einer agonistischen Wirkung, während bei geringer cAMP-Produktion eher von einem antagonistischen Liganden ausgegangen werden kann.

Dabei wurde ein cAMP-Versuchs-System (BiotrakTMcAMP[¹²⁵I], Amersham Pharmacia Biotech., USA) verwendet. Es wurden 3×10^4 HT-29-Zellen in 24Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen VIP oder VIP-Derivat als Doppelansätze 15 min. bei 37 °C in Inkubationsmedium (10 mM IBMX, 68 mM CaCl₂, 25 mM HEPES in RPMI 1640) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol/HCl über Nacht bei -20 °C extrahiert. Die Ethanolextrakte wurden in FACS-Röhrchen überführt, unter Vakuum konzentriert und in 0,05 M Acetatspuffer aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit einer Lösung bestehend aus radioaktiv markierten cAMP (Adenosin-3',5'-zyklophosphorsäure 2'-O-succinyl-3-[¹²⁵I]-iodotyrosinmethylester) und mit Serum, welches Antikörper gegen cAMP enthielt für 3 h bei 4 °C. Nach Ablauf der Inkubation wurde ein weiteres Serum mit dem Antikörper Amerlex M, welcher an magnetisierbare Polymerpartikel immobilisiert war, hinzugefügt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels 10minütiger Zentrifugation bei 1800 g konnte der gebundene von dem ungebundenen Liganden abgetrennt werden. Die Pellets wurden 10 s im Gammacounter gezählt. Eine Standardreihe, bestehend aus cAMP-Standards zwischen 25 fmol und 1600 fmol, diente für die Bestimmung der cAMP-Konzentrationen, wobei bei sämtlichen gemessenen Werten der Quotient B/B_0 (B = cAMP-Konzentration bei Stimulation mit entsprechendem Konjugat/ B_0 = cAMP-Konzentration ohne Stimulation) verwendet wurde.

4.8 Bildgebende *in vivo* Charakterisierung

Die Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Peptiden im Tiermodell kann wichtige Indizien für das bildgebende Potential dieser Verbindungen liefern. Eine bewährte Methode besteht darin, die Verteilung des Farbstoffes durch Bestrahlung und Beobachtung der Fluoreszenzverteilung in Nacktmäusen mittels einer CCD-Kamera zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Applikation zu verfolgen (Riefke et al., 1996, Becker *et al.*, 2001).

Für die Transfektion tumortragender Nacktmäuse wurden RIN38 (VPAC₁)-Zellen subkutan in die rechte Flanke von Mäusen (NMRI nu/nu) injiziert. Um die Autofluoreszenz der Mäuse, welche durch Pheophorbide in dem Standardfutter hervorgerufen werden, wurden die Tiere 10 - 14 Tage vor dem Experiment einer Diät mit Niedrig-Pheophorbid-Futter (C1039, Altromin GmbH, Lage), unterzogen (Dickson *et al.*, 1995). Nach ca. 14 Tagen, wenn die Tumore eine Größe von ungefähr 3 - 8 mm erreicht hatten, konnten die Tiere für die folgenden Experimente herangezogen werden. Die Mäuse wurden mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion von Ketamin: Hydrochlorid (1:1) anästhesiert. Die unterschiedlichen VIP-Derivate wurden mit einer Konzentration von 0,02 µmol/kg intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. Die Fluoreszenzverteilung der VIP-Farbstoff-Konjugate wurde mittels einer CCD-Kamera zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation gemessen. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde mit Hilfe eines Nd:YAG-

Laser (Coherent Inc., USA) durchgeführt. Hierfür wurde eine experimentelle Anlage der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin (Dr. B. Ebert, Prof. Dr. H. Rinneberg) verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Programm WinView 1.6.2. (Princeton Instruments Inc., USA) bearbeitet.

5. Ergebnisse

Für die Entwicklung und Charakterisierung stabiler VIP-Analoga wurden folgende Versuchsschritte durchgeführt (Abb. 5.1).

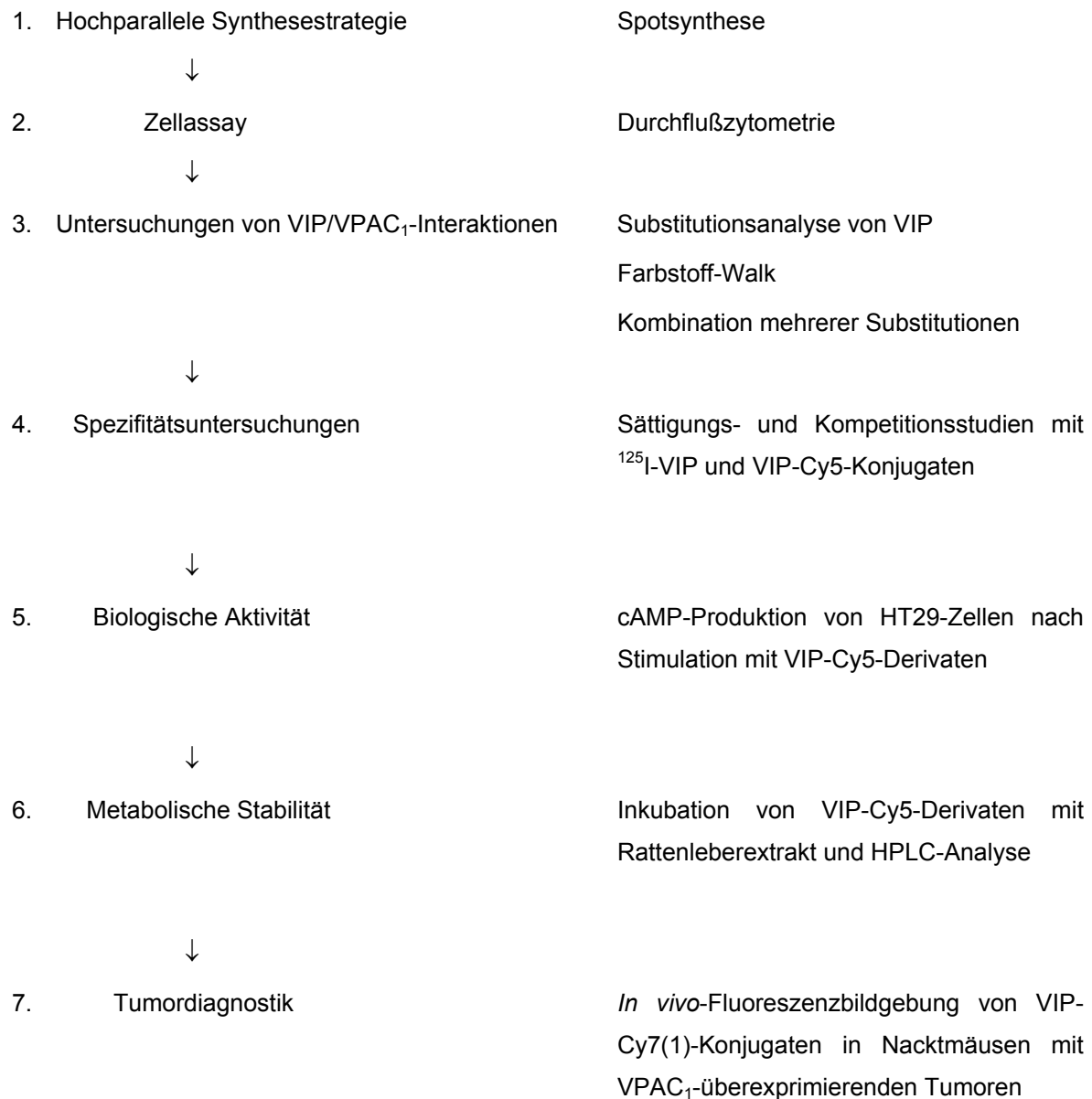


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Die Zahlen in den Klammern nach den Farbstoffbezeichnungen Cy5 und Cy7 geben die Position des Farbstoffes in der VIP-Sequenz an.

5.1 Spotsynthese von farbstoffmarkierten löslichen Peptidliganden

5.1.1 Modifikation der Cellulose

Im Rahmen dieses Projektes sollten abspaltbare Peptidfarbstoffkonjugate für den direkten Einsatz in Zellversuchen mittels Spotsynthese (Frank, 1992) hergestellt werden. Es wurde eine neue Synthesestrategie (Abb. 5.2) (Licha *et al.*, 2000a) entwickelt, bei der ein orthogonaler Linker zwischen Cellulose und Peptid eingesetzt wurde, welcher die Freisetzung der Konjugate mit Hilfe einer milden basischen Reaktion ermöglichte. Durch die Behandlung der Cellulose mit Epibromhydrin, Perchlorsäure in Dioxan und Diaminopropan wurde eine sog. CAPE-Membran generiert (Volkmer-Engert *et al.* 1997), welche anschließend mit Mercaptopropionsäure funktionalisiert wurde. Die Mercaptofunktion wurde mit 10 % Cäsiumcarbonat aktiviert und anschließend wurde die erste Aminosäure als Fmoc-aminosäure-Brompropylester gekoppelt.

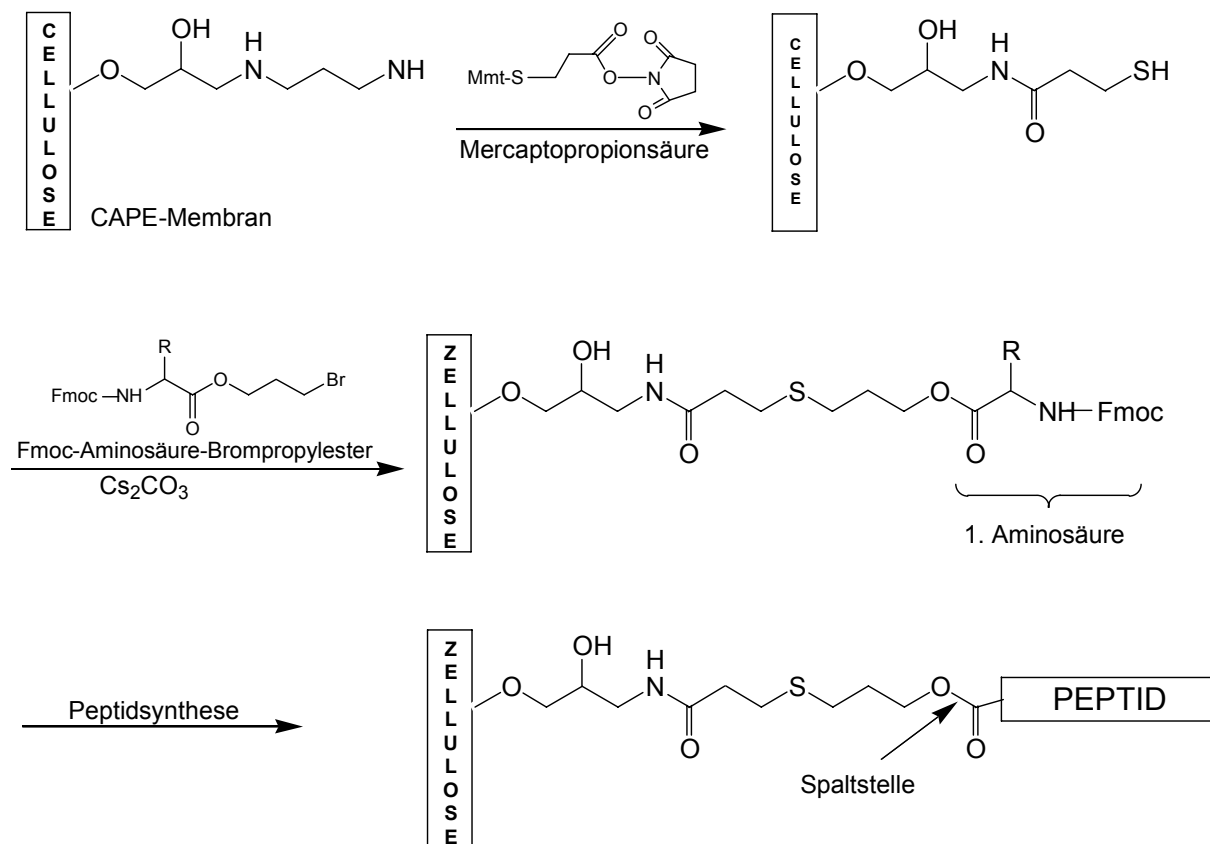


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Modifikation der Membran

Üblicherweise wird die Esterbindung zwischen Cellulose und Peptid mittels Aminolyse getrennt, wobei die Cellulosemembran einer Ammoniakatmosphäre im Exsikkator ausgesetzt wird (Volkmer-Engert *et al.*, 1997). Die Peptidspots werden ausgestanzt und in geeignete Reaktionsgefäße überführt. Anschließend können die Peptide direkt mit Wasser oder Puffer von der Membran gelöst werden und man erhält somit Peptidcarboxamide. Dieses Verfahren sollte hier jedoch nicht verwendet werden, da zum einen die verwendeten Cyaninfarbstoffe in Gegenwart von Ammoniak stark zersetzt wurde, und zum anderen Peptidkonjugate mit authentischen C-Termini erwünscht waren. Die Farbstoffzersetzung bei trockener Amminolyse führte zu rotgefärbten Lösungen bei eigentlich zu erwartender Blaufärbung.

5.1.2 Modellsynthesen

Es wurden zuerst unterschiedliche 5mere Modellsequenzen synthetisiert und N-terminal mit dem Carbocyaninfarbstoff Cy7 verknüpft. Die Peptide wurden als Spots mit einer Größe von $0,25 \text{ cm}^2$ auf die merkaptofunktionalisierte Membran pipettiert. Für die Abspaltung der Peptide von der Membran wurden unterschiedliche NaOH-Konzentrationen mit den entsprechenden Äquivalenten der neutralisierenden Säure und verschiedenen Inkubationszeiten untersucht, wobei sich eine NaOH-Konzentration von 0,16 M mit einer Reaktionszeit von 10 min. als günstigste Bedingungen erwiesen.

In Abb. 5.3 sind zwei typische HPLC-Chromatogramme der Verbindung LAILA-Cy7(1) gezeigt. Die Chromatogramme lassen erkennen, daß das Produkt in guter Reinheit erhalten werden konnte. Die Detektion bei 214 nm ließ noch einen ca. 10 %igen Anteil von freien Peptiden erkennen, was auf eine nicht vollständige Beladung mit dem Farbstoff hinweist. Die gewonnene Stoffmenge wurde mittels Photometrie unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von $150000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 750 nm bestimmt und betrug für die 5meren Konjugate ca. 30 – 40 nmol.

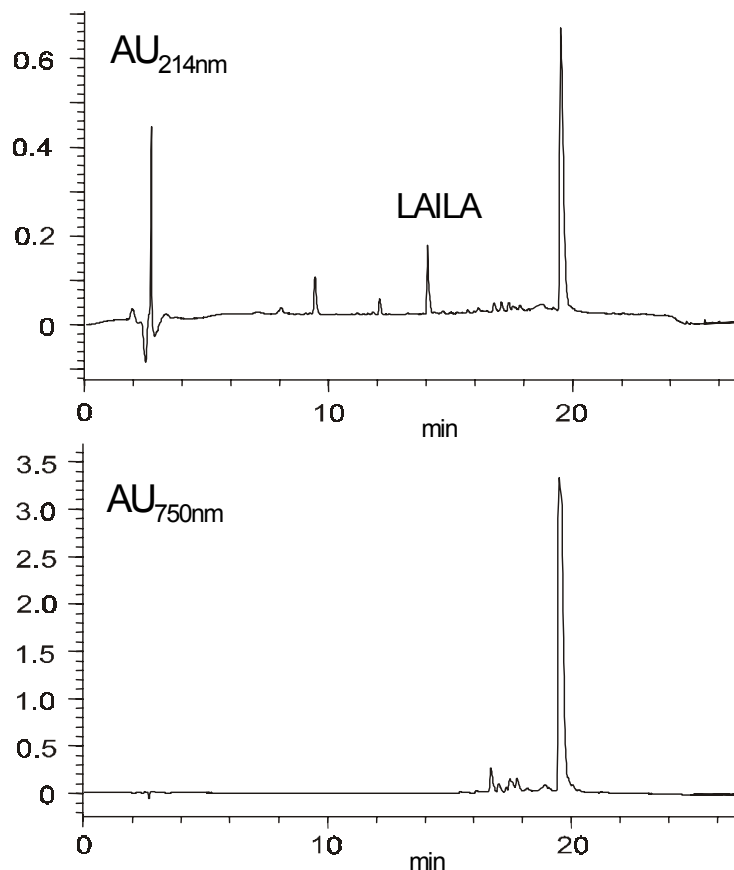


Abb. 5.3: HPLC-Chromatogramm des 5meren Peptides mit der Sequenz LAILA mit N-terminal gekoppeltem Cy7 bei 214 nm (oben) und 750 nm (unten).

Die Modellsequenzen dienten außerdem dazu, den Einfluß unterschiedlicher Aminosäuren auf den Farbstoff bzw. die Ausbeute der Peptid-Farbstoffkonjugate zu überprüfen. Hierfür wurde bei dem Modellpeptid die N-terminale Aminosäure jeweils mit den 20 natürlichen genkodierte Aminosäure substituiert und an diese Aminosäure jeweils das Farbstoffmolekül gekoppelt. Die Peptid-Farbstoff-Konjugate wurden nach der Abspaltung von der Membran photometrisch quantifiziert, wobei zwischen den unterschiedlichen Derivaten kaum Unterschiede bezüglich der Quantität festgestellt wurden.

In dem nächsten Schritt wurden Peptide mit einer Länge von bis zu 11 Aminosäuren synthetisiert. Diese Sequenzen stellen Teilsequenzen der nativen VIP-Sequenz dar. In Abb. 5.4 sind die Chromatogramme der analysierten 11meren VIP-Teilsequenz VIP(14-24) dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die Einheitlichkeit im Vergleich zu den 5meren Konjugaten verringert ist. Dennoch ist das gewünschte Produkt als eindeutiges Hauptprodukt zu identifizieren.

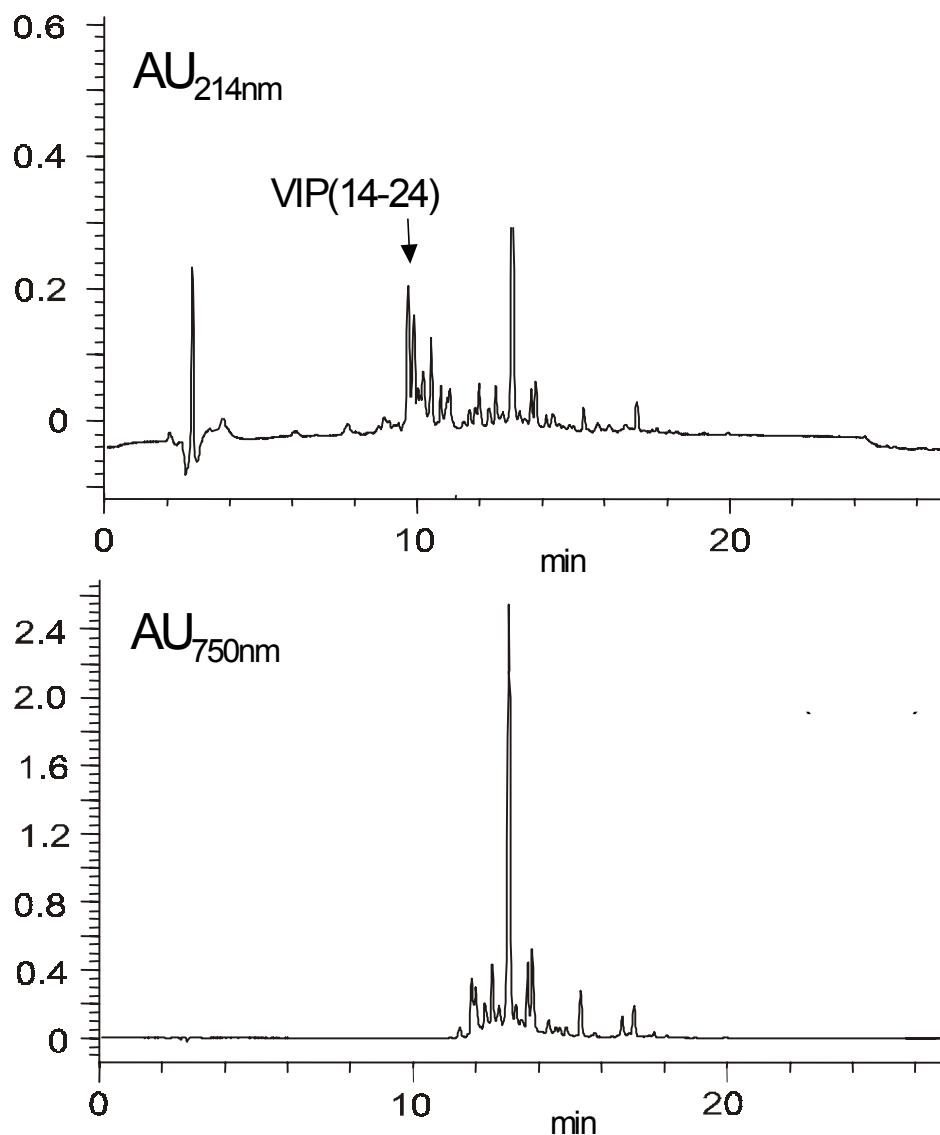


Abb. 5.4: HPLC-Chromatogramm des 11meren VIP-Konjugates (14 – 24) mit N-terminal gekoppeltem Cy7 bei 214 nm (oben) und 750 nm (unten).

Wie zu erwarten verringerte sich die Synthesequalität, d.h. der Anteil an Nebenprodukten steigt an mit zunehmender Sequenzlänge des Peptids.

Abb. 5.5 zeigt ein HPLC-Chromatogramm des 28meren VIP, an welches Cy5 an das N-terminale Ende gekoppelt wurde. Es konnte ein Produktpeak von ca. 30 % bestimmt werden. Dieser Peak konnte mittels massenspektrometrischer Analyse als das Peptid mit der zuvor berechneten Masse identifiziert werden.

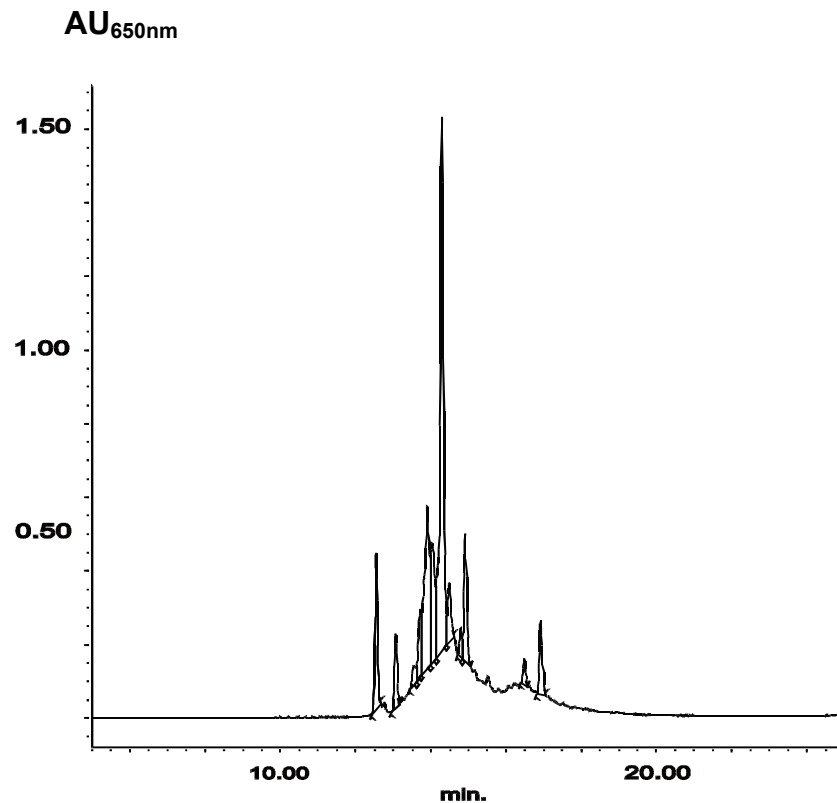


Abb. 5.5: HPLC-Chromatogramm eines 28meren VIP-Derivates mit N-terminal markierten Cy5-Farbstoff bei 650 nm

5.1.3 Kopplungsausbeute der Aminosäure-Brompropylester

Zur Etablierung der Synthesestrategie wurden die Kopplungsausbeuten der S-Alkylierung für jede Aminosäure mit Hilfe der Fmoc-Bestimmung getestet (Abb. 5.6). Brompropylester der kritischen Aminosäuren wie Cystein, Histidin, Asparagin, Glutamin und Arginin wurden als 0,8 M Lösungen vierfach auf die Membran pipettiert, während die anderen Fmoc-Aminosäure-Brompropylester als 0,6 M Lösungen wie üblich doppelt gekoppelt wurden.

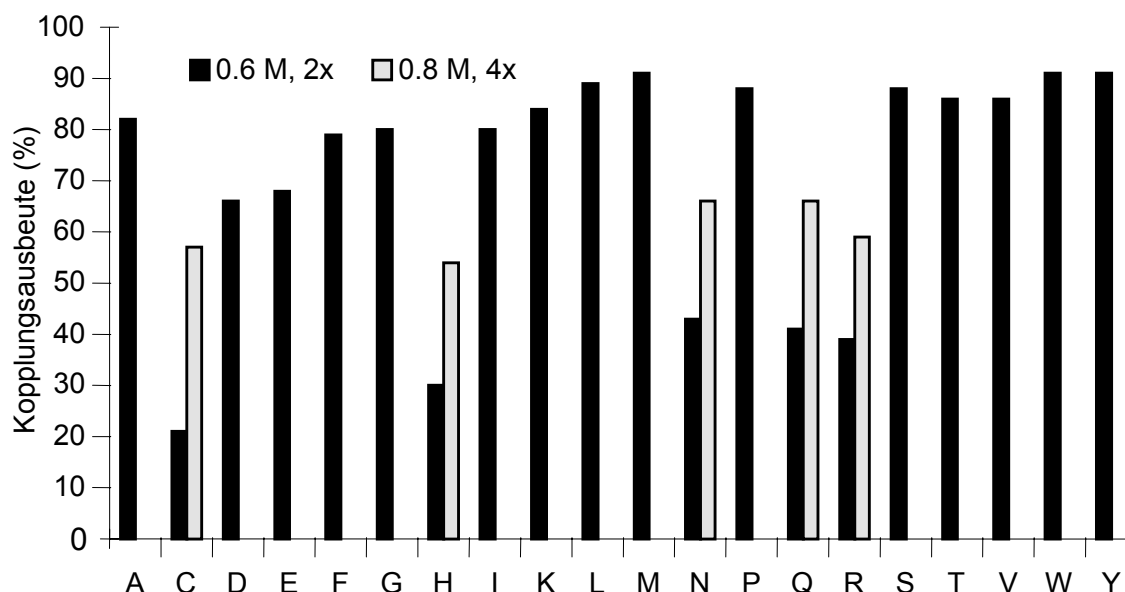


Abb. 5.6: Kopplungsausbeuten der Reaktion der 3-Brompropylester aller 20 natürlichen Aminosäuren mit der mercaptofunktionalisierten CAPE-Membran

Die Darstellung der Kopplungseffizienzen (Abb. 5.6) zeigen, daß sich die verschiedenen Aminosäure-3-Brompropylester auf der CAPE-Membran der meisten Aminosäuren sehr ähnlich verhalten. Die kritischen Aminosäuren werden weniger gut gekoppelt, was aber durch häufigere Kopplungen verbessert werden kann.

5.1.4 Stabilität der Cyaninfarbstoffe unter Spotsynthesebedingungen

Für die Einsetzbarkeit von Carbocyaninfarbstoffen in der Spotsynthese sollte die Stabilität der Farbstoffe in Trifluoressigsäure/Wasser-Gemischen, mit welchen die Cellulosemembrane zur Abspaltung der Schutzgruppen inkubiert werden, untersucht werden. Hierzu wurden 2,5 μ M Lösungen des Cy7-Farbstoffes in verschiedenen TFA/Wasser-Gemischen inkubiert und photometrisch vermessen (Abb. 5.7). Die Ergebnisse zeigen, daß die Stabilität des Farbstoffes in einem TFA/Wasser-Gemisch von 95:5 ausreichend ist und es nur zu geringer Abnahme der Farbstoffabsorption kommt. Dagegen ist bei herabgesetztem Anteil an TFA eine merklich verringerte Stabilität zu beobachten. Das zur Abspaltung der Peptidschutzgruppen einzusetzende Gemisch von 95:5 kann somit ohne Bedenken eingesetzt werden.

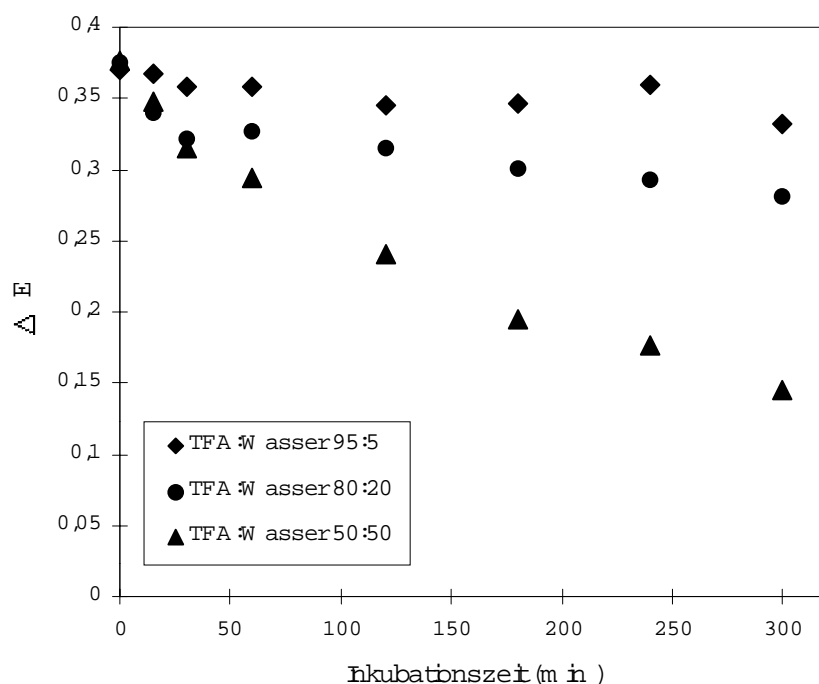


Abb. 5.7: Stabilität des Cy7-Farbstoffes in verschiedenen TFA/Wasser-Gemischen

5.1.5 Aktivierung der Farbstoffkopplung

Für die Kopplung des Farbstoffmoleküls an eine Peptidsequenz bei der Spotsynthese wurden verschiedene Aktivierungsreagenzien, kombiniert mit unterschiedlichen Basen, untersucht (Tab 5.1). Cy5 wurde an das N-terminale Ende eines Modellpeptids mit der Sequenz LAILA gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde über die Farbstoffquantifizierung bei 650 nm und unter Berücksichtigung des molaren Exkinktionskoeffizienten $150000 \text{ l/mol}^{-1}$ berechnet. Hierbei hat sich gezeigt, daß die Veresterung mit DIC/DIPA und EEDQ zu keiner Farbstoffkopplung und die Verwendung DIC/OPfp zu einer sehr geringen Kopplung führte. Die sonstigen Aktivierungsmethoden ergaben ähnliche Kopplungsausbeuten zwischen 68 und 93 nmol pro Spot. In dem weiteren Versuchen wurde das Farbstoffmolekül mit einem Äquivalent TBTU und zwei Äquivalenten DIPA gekoppelt.

Kopplungsreagenzien	Ausbeute [nmol/Spot]
1 eq TBTU, 2 eq DIPA	72
1 eq HATU, 2 eq DIPA	71
1 eq DIC, 2 eq DIPA	0
1 eq EEDQ	0
1 eq DIC, 1 eq OPfp	7
1 eq TBTU, 1 eq NMI	68
1 eq HATU, 1 eq NMI	93

Tabelle 5.1: Kopplungseffizienz des Cy5-Farbstoffes an das N-terminale Ende des Modellpeptides LAILA in Abhängigkeit der Aktivierungsmethode

5.2 Durchflußzytometrie als Screeningmethode für Farbstoff-Peptidkonjugate

5.2.1 Vorversuche

Die aus der Spotsynthese erhaltenen VIP-Konjugate wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie hinsichtlich ihrer Bindung an VPAC₁-überexprimierende Zellen (RIN38) getestet. Aufgrund der vorhandenen Filter des Durchflußzytometers wurde der Carbocyaninfarbstoff Cy5 an die VIP-Derivate gekoppelt. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy5 und Cy7 unterscheiden sich in der Länge der Polymethinkette nur um 2 C-Atome, so daß davon ausgegangen wird, daß die photophysikalischen Eigenschaften annähernd gleich sind. Da der Farbstoff gegenüber dem in der Spotsynthese zur Abspaltung der Fmoc-Gruppen verwendeten Piperidin sehr instabil ist, wurde die Farbstoffkopplung nach Beendigung der Synthese an das N-terminale Ende der Sequenz durchgeführt.

Anfangs wurde überprüft, wie sich die Peptidkonjugate der Spotsynthese im Zellassay hinsichtlich ihrer Zellbindung verhalten. Hierfür wurden VIP-Cy5(1)-Konjugate, die mittels Spotsynthese hergestellt worden waren, mit präparativ hergestellten VIP-Cy5(1)-Konjugaten verglichen. In Abb. 5.8 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten dargestellt, wobei erkennbar ist, daß die Peptidkonjugate aus der Spotsynthese stark verringerte Bindungen zu den Zellen aufweisen. Im Vergleich zu präparativ hergestellten VIP-Cy5(1)-Derivaten, welche eine

Fluoreszenzintensität von ca. 620 erreichen, zeigen VIP-Cy5-Konjugate der Spotsynthese mit einem FL4-Median von ungefähr 120 nur 1/6 der Fluoreszenzintensität. Da dieser Kontrast sehr groß ist, wurde in Abb. 5.6 nicht die absolute Fluoreszenzintensität der präparativ hergestellten VIP-Cy5-Konjugate dargestellt.

Mit Hilfe der Spotsynthese wurden weiterhin verschiedene N-terminal Cy5-markierte VIP-Fragmente synthetisiert und auf Zellbindung getestet. Es ist erkennbar, daß zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Fragmente und dem nativen VIP-Konjugat eine für ein Screening ausreichender Unterschied bestand.

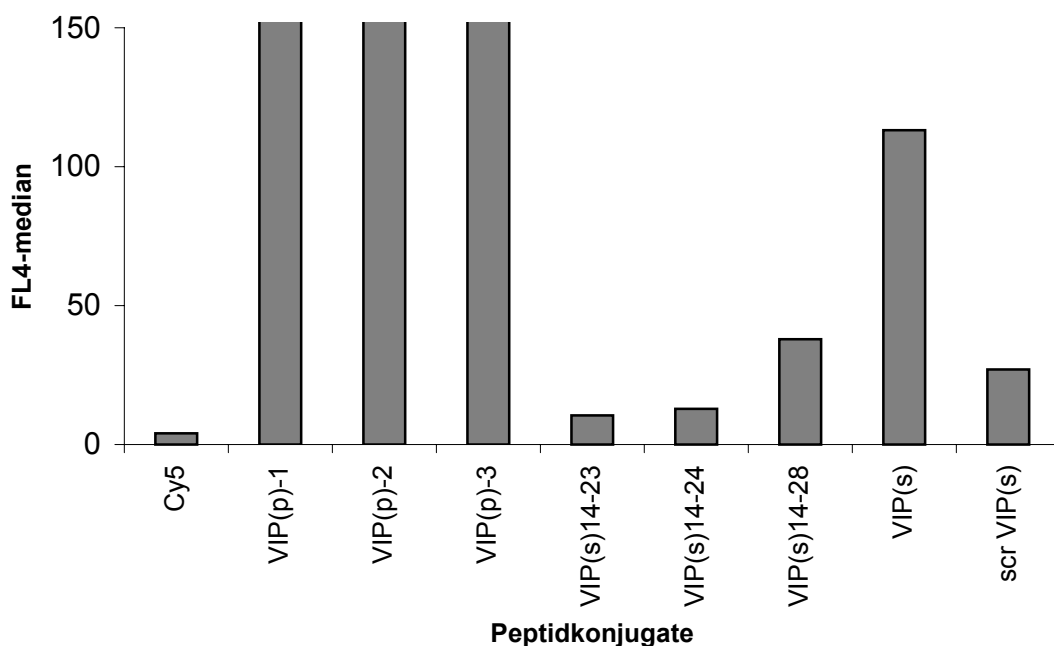


Abb. 5.8: Vergleich von wtVIP-Cy5(1)-Konjugaten, welche präparativ (VIP(p)1-3 und per Spotsynthese VIP (s) hergestellt wurden. Desweiteren wurden VIP-Cy5(1)-Fragmente und ein „scrambled“ VIP-Cy5(1)-Derivat per Spotsynthese synthetisiert und im Durchflußzytometer gemessen.

Als zusätzliche Kontrolle wurde ein „scrambled“ VIP-Cy5 mit einer Zufallssequenz hinsichtlich der Zellbindung untersucht (siehe S. 51). Das „scrambled“ VIP hat eine Aminosäuresequenz mit demselben Aminosäuregehalt wie die Wildtyp-Sequenz. Die Reihenfolge der Aminosäuren wurde jedoch mit dem Programm Lisa 1.571 zufällig bestimmt. Dieses Peptid wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigte bei der Untersuchung im Durchflußzytometer eine ausreichend geringe Zellbindung.

Die Ergebnisse des Vorversuches schienen brauchbar genug, um eine Peptidbibliothek zu generieren, welche aus einer Vielzahl unterschiedlicher VIP-Derivate bestand. Hierfür wurde

eine Substitutionsanalyse des 28meren VIP durchgeführt, bei der systematisch jede Aminosäureposition der Peptidsequenz durch alle natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt wurde. Für das VIP ergaben sich somit 560 Derivate, welche parallel auf einer Cellulosemembran (DIN A4) synthetisiert wurden. Von den 560 Derivaten wurden stichprobenartig einzelne VIP-Konjugate mittels HPLC analysiert und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Ein HPLC-Chromatogramm, welches den typischen Reinheitsgrad für ein Peptid dieser Länge aufweist, wurde schon in Abb. 5.5 gezeigt.

Nach Lösen der VIP-Derivate in Phosphatpuffer wurden die gelösten Substanzmengen jeder Peptidlösung unter Annahme eines mittleren molaren Extinktionskoeffizienten von ca. $150000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ photometrisch bestimmt. Demnach konnten 30 - 40 nmol Substanzgemisch von der Membran gelöst werden.

Für die Untersuchung der VIP-Derivate mittels Durchflußzytometrie wurden verschiedene Konzentrationen der Peptide bis zu $1 \mu\text{M}$ überprüft. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die verschiedenen Konzentrationen der farbstoffmarkierten VIP-Derivate mit $1 \mu\text{M}$ nicht markiertem VIP verdrängt. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung wurde die spezifische Bindung berechnet (Abb. 5.9). Bei einer Konzentration von $0,15 \mu\text{M}$ VIP-Cy5(1) ist der Gegensatz zwischen spezifischer Bindung und unspezifischer Bindung am größten, so daß im weiteren Versuchsverlauf diese Konzentration verwendet wurde.

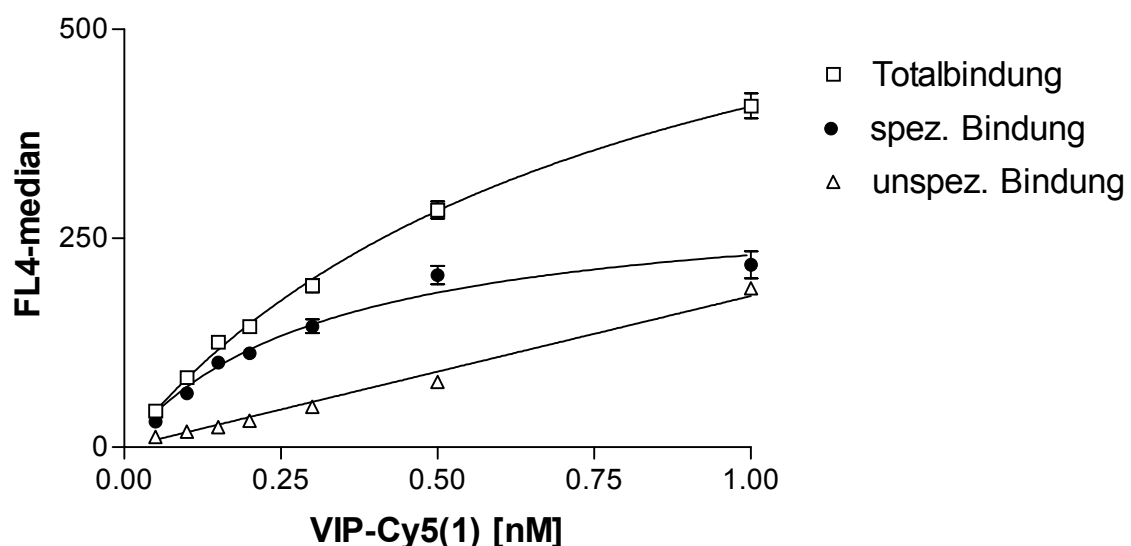


Abb. 5.9: Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung an RIN38(VPAC₁) von VIP-Cy5(1)

5.2.2 Substitutionsanalyse von VIP-Cy5(1)

Es wurde eine komplette Substitutionsanalyse des 28meren VIP mit N-terminal gekoppeltem Cy5 durchgeführt. Hierfür wurden 533 VIP-Derivate auf einer N-modifizierten CAPE-Membran synthetisiert, von der Membran abgespalten und bezüglich ihrer Zellbindung und Internalisierung an RIN38(VPAC₁) mittels Durchflußzytometrie getestet.

In Abbildung 5.10 ist eine schematische Darstellung der Substitutionsanalyse gezeigt. Die einzelnen Kästchen repräsentieren die Fluoreszenzgesamtintensitäten der einzelnen VIP-Cy5-Derivate. Auf der linken Seite sieht man die native Sequenz des VIP vom N-Terminus (oben) zum C-Terminus (unten) und oben stehen die zu substituierenden Aminosäuren. Jedes einzelne Kästchen stellt ein anderes VIP-Derivat dar, das sich in seiner Sequenz um nur eine Aminosäure gegenüber dem Wildtyp unterscheidet. In jeder Reihe tritt ein Wildtyp-Peptid auf, welches insgesamt 28 Wildtyp-Peptide ergibt. Bei der Untersuchung der 28 Wildtyp-Peptide bezüglich ihrer Bindung an RIN38(VPAC₁) wurde eine Standardabweichung von 11 % berechnet. Diese relativ geringe durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert spricht für eine gleichmäßige Synthese auf der Cellulose-Membran. Aufgrund dieser niedrigen Standardabweichung konnten die Werte der Wildtyp-Peptide auf 100 % gesetzt werden und die Werte anderer Derivate prozentual dem Wildtyp angeglichen werden. Die prozentuale Verteilung kann anhand der Graufärbung der einzelnen Kästchen abgelesen werden. Schwarze Kästchen stehen für eine Bindung, die vergleichbar oder stärker wie der des Wildtyp ist, während weiße Kästchen eine Bindung im unspezifischen Bereich, also keine tatsächliche Bindung, bedeuten. Graue Kästchen repräsentieren ein Bindungsverhalten zwischen unspezifischer und starker Bindung; je dunkler der Grauton, desto stärker die Bindung zu RIN38(VPAC₁).

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
1H	46	143	43	33	103	72	100	126	52	156	77	60	45	58	85	68	76	33	25	6
2S	91	93	32	58	167	77	96	184	50	95	131	50	66	235	68	100	152	121	235	121
3D	111	132	100	110	110	75	103	105	66	101	96	69	66	57	54	59	67	89	149	86
4A	100	97	31	33	135	120	62	95	59	77	111	66	56	110	76	130	63	79	172	140
5V	66	81	33	43	100	84	70	107	66	113	105	52	41	77	82	59	114	100	144	95
6F	21	7	18	16	100	22	26	78	105	78	51	4	4	20	28	20	12	9	75	61
7T	53	86	28	29	58	41	63	62	41	69	72	89	36	60	57	68	100	111	94	71
8D	133	178	100	104	231	153	199	223	240	225	208	190	71	250	407	177	219	220	251	184
9N	84	174	45	71	151	125	104	114	102	115	145	100	57	117	153	114	102	89	135	117
10Y	39	81	15	17	88	18	26	40	45	90	63	28	20	27	39	35	26	49	132	100
11T	116	240	33	46	178	106	87	211	216	169	111	146	41	128	246	108	100	112	155	137
12R	49	91	19	25	66	25	42	50	85	60	57	38	15	43	100	38	42	48	80	57
13L	80	113	13	17	86	21	60	84	79	100	80	35	14	49	92	55	45	66	123	87
14R	39	113	9	25	63	26	28	73	87	89	63	23	15	43	100	24	26	49	71	39
15K	72	192	17	33	108	37	57	87	100	104	92	52	15	74	138	49	55	76	81	90
16Q	100	154	19	41	94	39	48	108	106	115	108	69	21	100	150	73	84	120	174	107
17M	78	129	31	54	106	45	74	118	91	111	100	90	18	141	118	70	56	72	126	87
18A	100	137	21	42	133	42	73	92	159	115	122	82	25	104	172	78	60	99	137	95
19V	110	149	12	15	80	26	22	105	28	104	65	19	18	26	49	23	29	100	91	66
20K	69	132	12	29	83	31	42	68	100	78	68	27	12	44	121	35	27	50	88	72
21K	61	104	29	46	75	22	46	51	100	69	66	59	11	65	94	49	46	66	117	67
22Y	19	83	8	10	97	15	21	49	24	53	35	14	14	18	42	17	18	62	115	100
23L	17	43	10	13	42	14	17	70	22	100	29	15	18	20	26	13	14	31	57	28
24N	111	160	35	54	95	26	59	125	76	79	136	100	28	85	80	95	73	141	191	65
25S	75	134	40	37	85	54	61	80	89	63	83	92	24	67	116	100	68	39	145	108
26I	25	46	9	12	76	13	21	100	46	119	58	15	9	24	65	112	40	85	115	122
27L	65	68	23	18	124	76	34	109	36	100	60	34	18	31	51	56	47	71	92	80
28N	68	104	45	59	88	81	55	53	76	72	82	100	17	69	62	60	60	61	108	32

Abb. 5.10: Vollständige Substitutionsanalyse von VIP-Cy5(1). Die Graustufen der einzelnen Kästchen stehen für die relative Bindungsstärke der Peptidkonjugate (siehe rechts) zu RIN38(VPAC₁) gegenüber der nativen markierten VIP-Derivat (= 100%).

0%
30-60%
60-90%
>90%

Die Substitutionsanalyse kann auf zweierlei Wegen betrachtet werden. Zum einen können einzelne Aminosäurepositionen begutachtet werden, zum anderen können die einzelnen Substituenten und deren Auswirkungen auf das Bindungsverhalten untersucht werden. Analysiert man einzelne Aminosäurepositionen, so fällt auf, daß es Reihen gibt wie zum Beispiel bei Position 8 oder 9, welche fast ausschließlich schwarze Kästchen aufweisen. Bei diesen Positionen ist die Substitution mit fast allen Aminosäuren möglich. In anderen Reihen dagegen, wie z. B. bei Position 22 oder 23, findet man viele weiße Kästchen. Diese Positionen reagieren sehr empfindlich gegenüber Substitutionen und sind für die Bindung zu RIN38(VPAC₁) von größerer Bedeutung. Leucin bei der Position 23 kann sogar durch keine andere Aminosäure ersetzt werden, so daß man annehmen kann, daß diese Position für die Bindung essentiell ist.

Andere Aminosäurepositionen können nur mit Aminosäuren substituiert werden, welche die gleichen physikochemischen Eigenschaften besitzen. Die Aminosäure Tyrosin z. B. kann in Position 22 nur durch aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan ersetzt werden, um ähnliche Bindungsstärken wie das Wildtyp-Peptid zu bewirken. Valin in Position 19 kann nur mit aliphatischen Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin und Leucin ausgetauscht werden. Die positiv geladene Aminosäure Lysin in Position 20 kann vorzugsweise mit der positiv geladenen Aminosäure Arginin substituiert werden. Es gibt allerdings auch Austauschmöglichkeiten, die nicht einfach zu erklären sind. So kann z. B. das Isoleucin in Position 26 sowohl mit Serin als auch mit Tryptophan substituiert werden.

Bei der Untersuchung einzelner Substituenten fällt auf, daß die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure bis auf Position 3 und 8 nicht in der VIP-Sequenz toleriert werden. Im Gegensatz dazu ist die Substitution mit positiv geladenen Aminosäuren sehr oft erlaubt. Die Aminosäure Prolin zeigt eine deutliche Reduzierung der Bindung bei sämtlichen Positionen der VIP-Sequenz.

Mit Hilfe der Ergebnisse der Substitutionsanalyse wurde ein sogenanntes VIP-Supermotiv (Abb.5.11) erstellt, welches ein vereinfachtes Bindungsmotiv von VIP darstellt. Aminosäurepositionen, bei denen mit mehr als 4 Aminosäuren substituiert werden konnten, wurden mit „X“ gekennzeichnet. Die Aminosäure Cystein wurde bei der Erstellung des Supermotives nicht berücksichtigt (siehe Diskussion).

Wildtyp	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	N
Supermotif	H	X	X	X	X	F	T	X	X	Y	X	R	L	R	K	X	X	X	V	K	K	Y	L	X	S	I	L	N
	F					K	V			L			R		F				A	R	R	F			N	L	F	W
	I						W			W			W		L				I		W	W			R	S	I	
	L														M				L						W	W	W	
															R				W						Y	Y		

Abb. 5.11: Schematische Darstellung des VIP-Supermotivs mit den stärksten Schlüsselaminosäuren (rot), X-Positionen (schwarz) und den restlichen Aminosäuren (blau).

Für die Verifizierung der Ergebnisse der Substitutionsanalyse wurden 30 verschiedene VIP-Derivate im präparativen Maßstab synthetisiert, N-terminal mit Cy5 markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (Abb. 5.12).

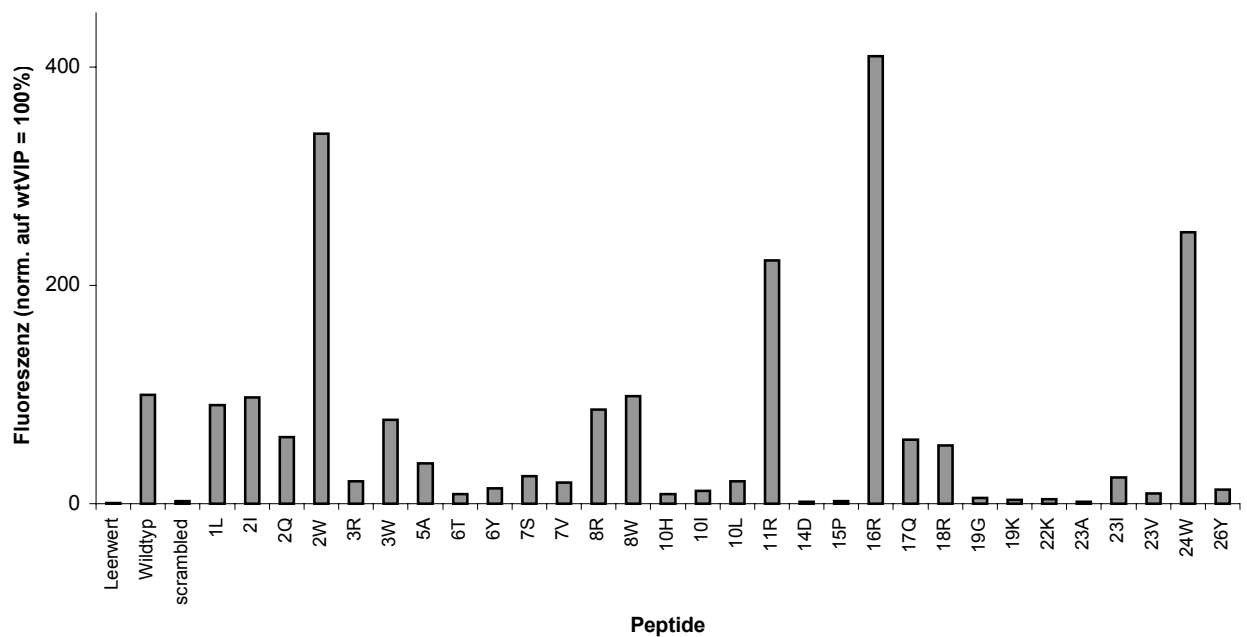


Abb. 5.12: FACS-Analyse ausgewählter N-terminal mit Cy5 markierter VIP-Derivate aus der Substitutionsanalyse, welche in präparativem Maßstab nachsynthetisiert wurden.

5.2.3 Farbstoff-Walk

Für die Bestimmung der optimalen Position des Carbocyaninfarbstoffes wurde unter Verwendung der Spotsynthese jede Position der VIP-Sequenz mit Lysin(Mmt) substituiert. Die Mmt-Gruppe konnte selektiv vor Abspaltung der restlichen Schutzgruppen entfernt werden, so daß an die ϵ -Aminogruppe des Lysins das Farbstoffmolekül gekoppelt werden konnte. Die Peptidderivate wurden von der Cellulose gelöst und ebenfalls mittels Durchflußzytometrie analysiert (Abb. 5.13).

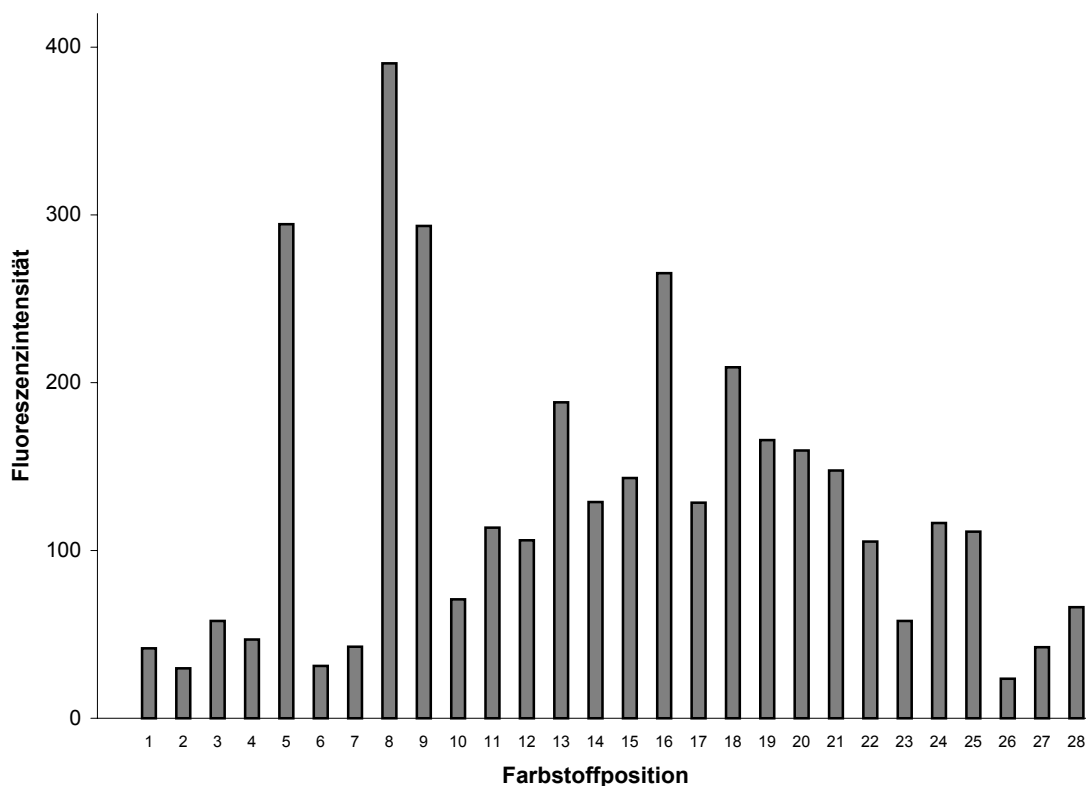


Abb. 5.13: Darstellung der Zellbindung von VIP-Derivaten, wobei an den Positionen 1-28 der Farbstoff Cy5 über ein Lysin gekoppelt wurde.

Die Darstellung des Farbstoff-Walks zeigt, daß die Substitution mit Lysin-Cy5 im N-terminalen Bereich des VIP-Moleküls, vor allem bei den Positionen 1 - 4 und 6 - 7, zu sehr niedrigen Bindungen führte. Auch im C-terminalen Bereich führte die Farbstoffkopplung (Position 26 und 27) zu geringeren Fluoreszenzintensitäten. Die Positionen 5, 8, 9 und 16 scheinen für die Positionierung des Farbstoffes am besten geeignet zu sein. Wenn nicht anders erklärt, wird die

Farbstoffposition bei der Bezeichnung der Konjugate in Klammern hinter dem Farbstoffnamen gestellt.

5.2.4 Variation der Farbstoffposition beim wtVIP und [Arg⁸]-VIP

Der Farbstoff-Walk hat gezeigt, daß die N-terminale Position die für die Kopplung ungünstigste Position der VIP-Sequenz ist, während die Positionen 5, 8, 9 und 16 besser für diesen Zweck geeignet sind. Aus diesem Grund wurden VIP-Derivate mit den verschiedenen Farbstoffpositionen im präparativen Maßstab nachsynthetisiert und mittels Durchflußzytometrie hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften überprüft (Abb. 5.14). In den weiteren Untersuchungen wurde mit dem Analogon [Arg⁸]-VIP gearbeitet. Dieses Derivat wurde ausgewählt, um zu demonstrieren, daß die Position 8 der VIP-Sequenz weder für die Funktion noch die Struktur relevant ist (siehe Diskussion). Auch hier wurde die Position des Farbstoffmoleküls variiert und ebenfalls in FACS-Untersuchungen gemessen (Abb. 5.14).

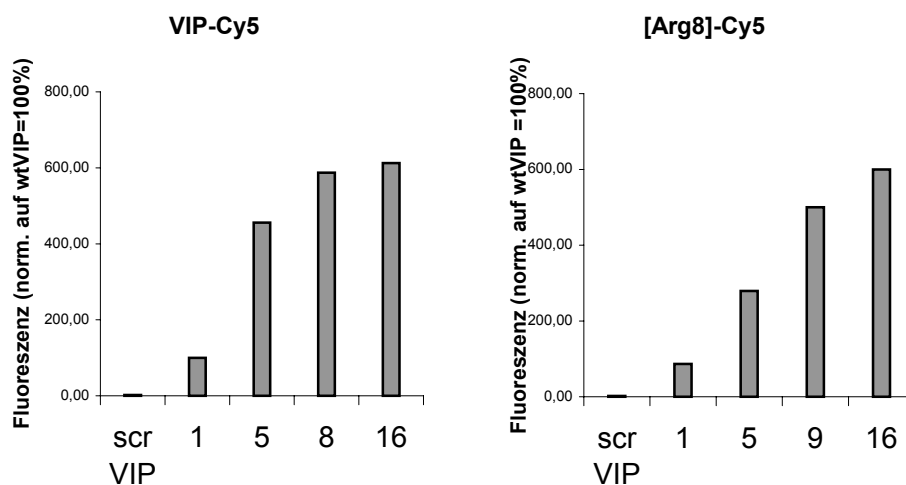


Abb. 5.14: Untersuchung der Zellbindung an RIN38(VPAC₁) von wtVIP (links) und [Arg⁸]-VIP mit variierten Positionen des Cy5-Farbstoffes. Als Kontrolle wurde N-terminal Cy5-markiertes scrVIP eingesetzt.

Mit Hilfe dieser Messung konnte bestätigt werden, daß die Positionen 5, 8 und 16 eine höhere Zellbindung induzieren als N-terminal markiertes VIP. Bei dem [Arg⁸]-VIP-Derivat wurde der Farbstoff anstatt an Position 8 an Position 9 gekoppelt. Für die Bindungseffizienz ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei dem Wildtyp-Peptid.

5.2.5 Durchflußzytometrische Bestimmung ausgewählter VIP-Cy5-Konjugate

Bei der Untersuchung der VIP-Cy5-Derivate der Substitutionsanalyse auf Zellbindung an RIN38(VPAC₁) konnte gezeigt werden, daß die Substitutionen mit Arginin und Tryptophan zu einer merklich höheren Zellfluoreszenz führten. Aus diesem Grund wurden diese Substitutionen in verschiedener Art und Weise kombiniert und erneut ihr Bindungsverhalten mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Position des Farbstoffes wurde hier nicht verändert, sondern war bei jedem Derivat am N-Terminus. In Abb. 5.15 sind die Ergebnisse im Vergleich zum Wildtyp-Peptid und zu einfach substituierten Derivaten gezeigt. Sämtliche Konstrukte zeigten in der Kombination eine gegenüber dem nativen Peptid erhöhte Zellbindung, wobei insbesondere Trp² mit Arg¹¹ und Arg⁸ zu einem ca. 8 – 10 fach erhöhten Signal führte.

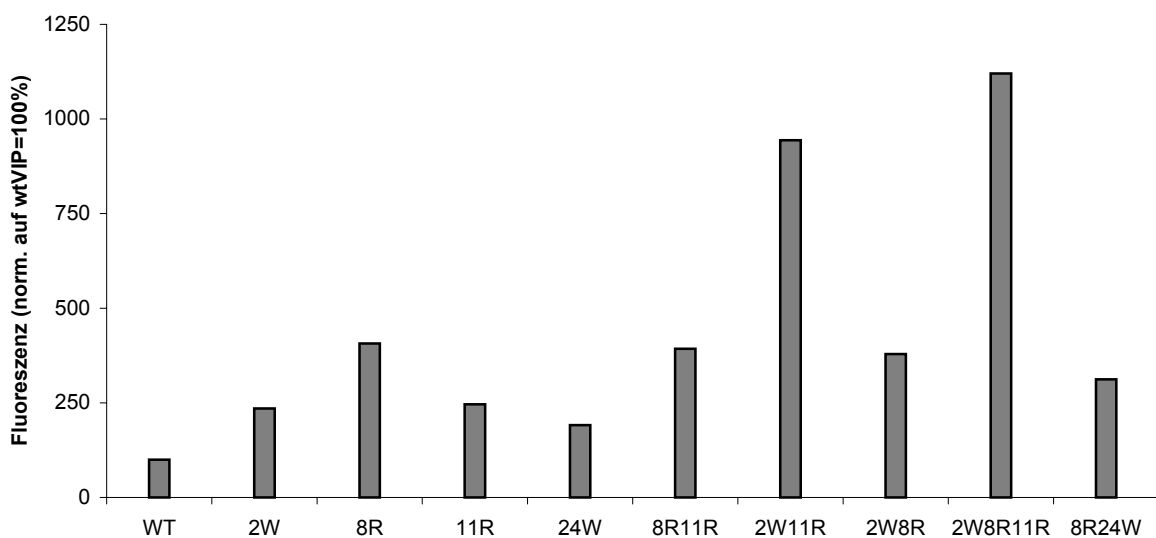


Abb. 5.15: Durchflußzytometrische Analyse von N-terminal mit Cy5 markierten VIP-Derivaten mit Kombinationen verschiedener Substitutionen

Weiterhin wurde die gesamte VIP-Sequenz verändert, indem das Peptid vollständig mit D-Aminosäuren synthetisiert wurde. Die Sequenz wurde ebenfalls in umgekehrter Reihenfolge und mit L-Aminosäuren hergestellt. Diese Peptide wurden im Zellassay mit RIN38(VPAC₁) inkubiert, welche jedoch zu keiner nennenswerten Bindung an diese Zellen geführt hat (Abb. 5.16).

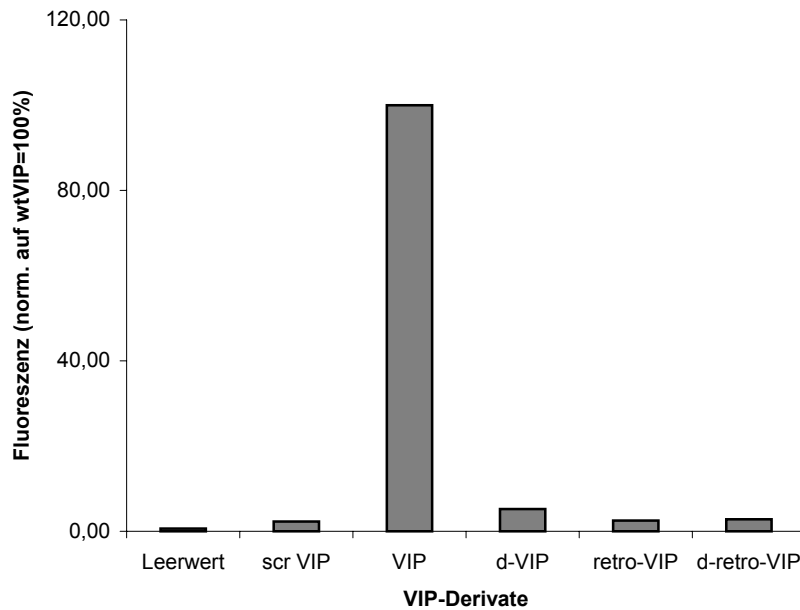


Abb. 5.16: Durchflußzytometrische Analyse von verschiedenen N-Terminal mit Cy5 markierten VIP-Derivaten

5.3 *In vitro* Charakterisierung

Für die quantitative Bestimmung der Rezeptoraffinität verschiedener VIP-Derivate wurden Verdrängungsstudien mit radioaktiv markiertem VIP durchgeführt. Bei diesem Assay wurden die Rezeptor-tragenden Zellen mit dem Radioliganden, in diesem Fall ^{125}I -VIP, und nicht radioaktiv markiertem VIP bzw. VIP-Derivat inkubiert. Nach der Inkubation mußte der nicht gebundene Ligand von dem gebundenen Liganden getrennt werden. In Vorversuchen wurde hierfür mit silikonisierten Eppendorfgefäßen gearbeitet, wobei die Trennung von gebundenen und ungebundenen Liganden mittels Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes erfolgte. Bei dieser Methode wurde jedoch festgestellt, daß ^{125}I -VIP stark an der Gefäßwand haftete und somit die Auswertung der Ergebnisse bedeutend negativ beeinflusste. Die Verwendung von Multi-Screen-Platten schien für diesen Versuch besser geeignet, da nicht nur die Handhabung entscheidend vereinfacht wurde, sondern auch zwischen speziellen Filtern mit unterschiedlichen Proteinabsorptionseigenschaften gewählt werden konnte. Es wurden Multi-Screen-Platten mit verschiedenen Filtertypen bestehend aus Glasfasern, Nitrocellulose und PVDF-Membranen getestet. Die PVDF-Membran mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ haben sich als die Filter herausgestellt, welche radioaktiv markiertes VIP am wenigsten gebunden hatte. Aus diesem Grund wurden dieser Membrantyp im weiteren Versuchen verwendet.

5.3.1 Sättigungsstudien

Als Referenz für den Vergleich verschiedener VIP-Derivate wurde zuerst das Sättigungsverhalten des radioaktiv markierten VIP und dessen unspezifische Bindung studiert. Hierfür wurden steigende Konzentrationen des Radioliganden in Abwesenheit (Totalbindung) und Anwesenheit (unspezifische Bindung) von 1 μM VIP inkubiert. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Totalbindung ermittelt. In Abb. 5.17 sind die Ergebnisse der Sättigungsstudie von ^{125}I -VIP dargestellt. Unter Verwendung des Programms PRISM 3.0 wurde über einen Scatchard-Plot eine K_D von 2,6 nM und die maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} von 181300 berechnet.

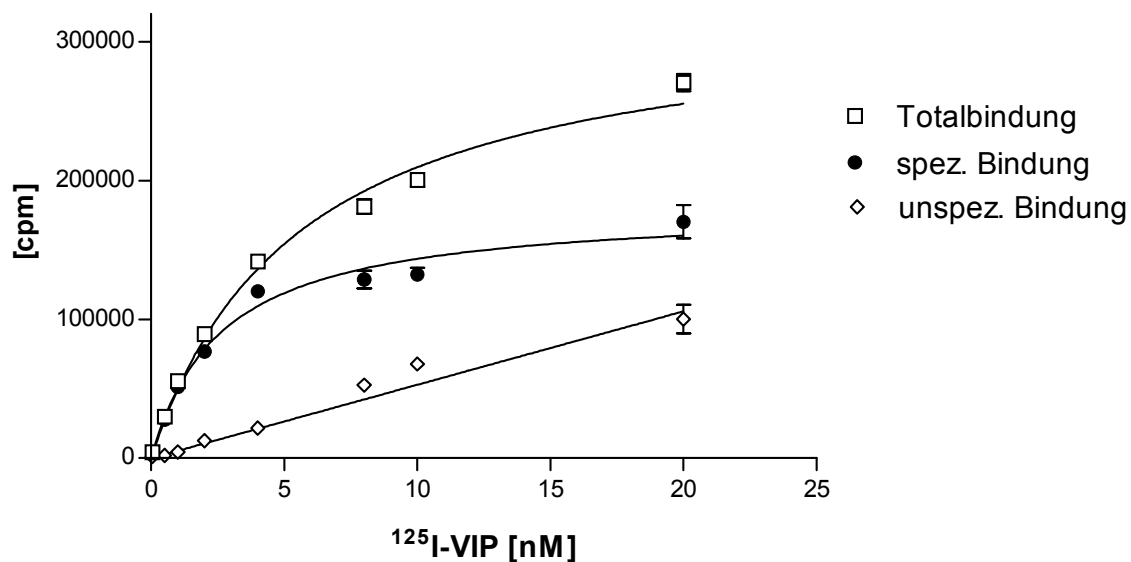


Abb. 5.17: Darstellung der Sättigungsstudie von ^{125}I -VIP in dem Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 20 nM

5.3.2 Kompetitionsstudien

In einem Kompetitionstest wurde die Konzentration von ^{125}I -VIP bei 0,1 nmol konstant gehalten und mit mehreren unterschiedlichen Konzentrationen nicht markiertem VIP inkubiert. Die gemessenen „Counts“ wurden über dem Logarithmus der Konzentration des nicht markierten VIP aufgetragen (Abb. 5.18).

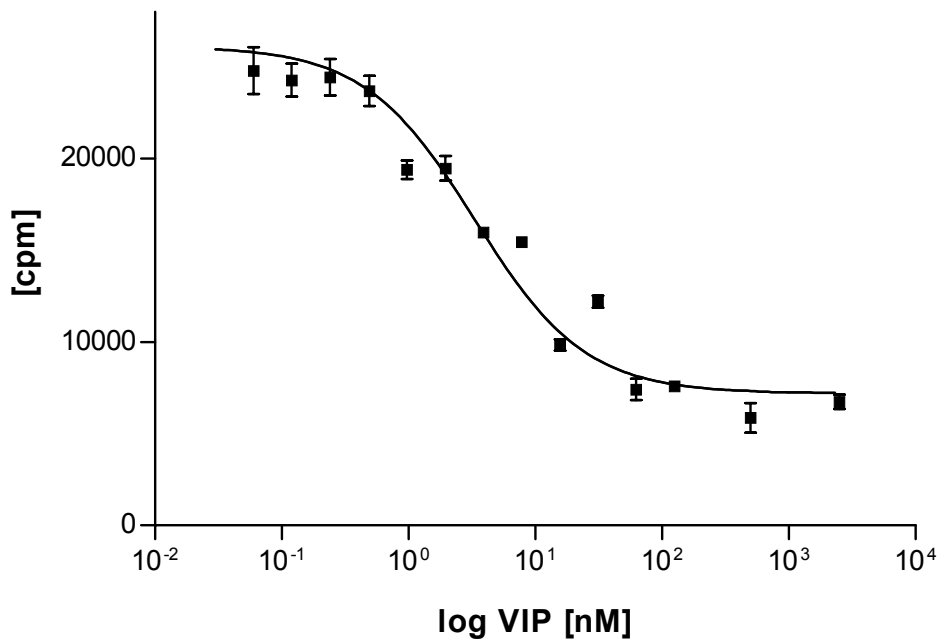


Abb. 5.18: Kompetitionskurve von ^{125}I -VIP mit verschiedenen Konzentrationen an nicht markiertem VIP

Für die Konkurrenz mit nicht markiertem VIP konnte eine IC_{50} von 3,34 nM und eine k_i von 2,8 nM ermittelt werden.

Weiterhin wurden 3 N-terminal mit Cy5 markierte VIP-Derivate, welche bei der Untersuchung mittels Durchflußzytometrie eine hohe Bindung zeigten, auf Konkurrenzvermögen gegenüber ^{125}I -VIP untersucht und mit dem nativen N-terminal markierten VIP-Derivat verglichen (Tab. 5.2).

VIP-Derivat	IC_{50} [nm]	k_i [nm]
wt VIP	4206	4006
[Trp ²]-VIP	2428	2330
[Arg ⁸]-VIP	240	229
[Arg ¹¹]-VIP	178	171
[Arg ¹⁶]-VIP	154	147

Tabelle 5.2: Vergleich von verschiedenen VIP-Derivaten mit N-terminal gekoppelten Cy5

Das N-terminal markierte Wildtyp-VIP-Derivat zeigte eindeutig die niedrigste Affinität zu RIN38(VPAC₁). Die Substitution von Ser² mit Tryptophan bewirkte eine Affinitätssteigerung um ca. 40 %. Die Substitution verschiedener Positionen mit Arginin steigerte die Affinität bei [Arg⁸]-VIP um das ca. 17fache und bis hin zu [Arg¹⁶]-VIP, welches sogar eine 27fach höhere Affinität als das native VIP-Cy5-Konjugat aufweist.

Als Kontrolle wurde das „scrambled“ VIP-Derivat eingesetzt, welches jedoch bei einer Konzentration von 1 μ M keinerlei Verdrängung des radioaktiv markierten VIP aufwies.

In weiteren Tests wurden VIP-Derivate untersucht, welche an verschiedenen Aminosäurepositionen mit Cy5 markiert wurden. Hierbei wurde das native VIP und das VIP-Analogon [Arg⁸]-VIP mit unterschiedlichen Positionen von Cy5 verglichen (Tab. 5.3). In Abb. 5.19 sind beispielhaft zwei Kompetitionskurven gezeigt.

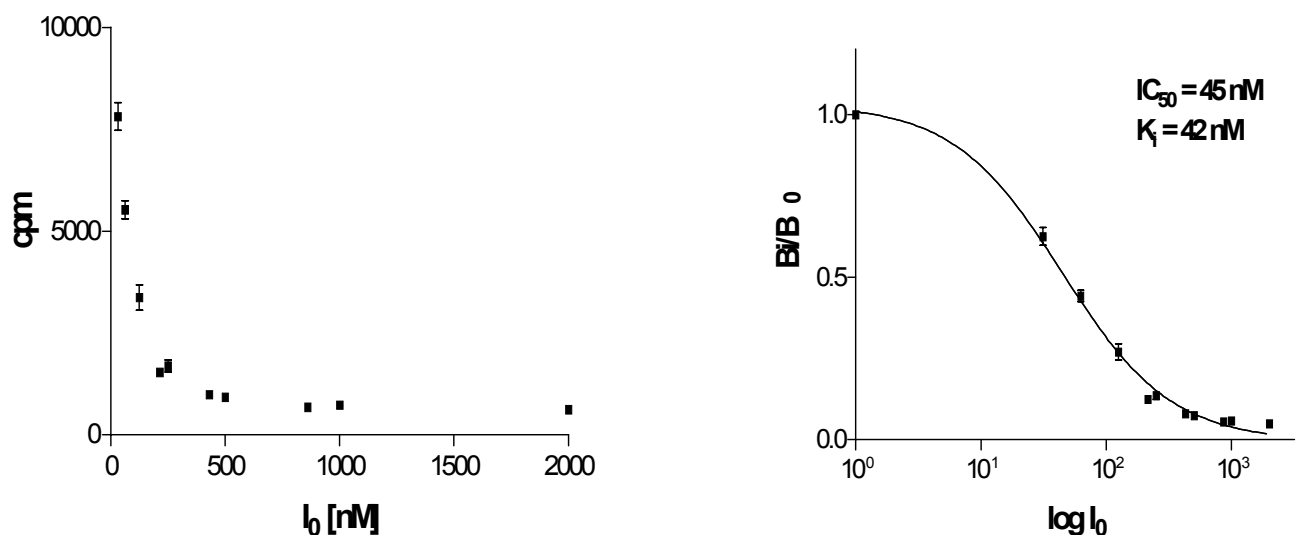


Abb. 5.19: Verdrängung von 0,1 nM ¹²⁵I-VIP mit verschiedenen Konzentrationen VIP-Cy5(16). Links sind die „counts per minute“ über der Peptidkonzentration und rechts das Verhältnis B_i/B₀ über dem Logarithmus der Peptidkonzentration aufgetragen.

Farbstoff- Position	IC₅₀ [nM] wt-VIP	k_i [nM] wt-VIP	IC₅₀ [nM] [Arg⁸]-VIP	k_i [nM] [Arg⁸]-VIP
1	4206	4006	240	229
5	247	235	204	194
16	45	42	104	99

Tabelle 4.3: IC₅₀- und k_i-Werte verschiedener VIP-Cy5-Derivate

Die N-terminale Farbstoffposition konnte bei dem [Arg⁸]-VIP-Konjugat, vor allem aber bei dem nativen VIP-Derivat, als die am wenigsten optimale Farbstoffposition bestimmt werden. Wie schon vorher erwähnt, konnte die unspezifische Bindung des N-terminal markierten nativen VIP-Derivat durch die Substitution von Asn⁸ durch Arginin entscheidend erhöht werden. Auch bei der Markierung an Position 5 zeigte das [Arg⁸-VIP]-Konjugat gegenüber dem nativen VIP-Derivat eine leicht höhere Affinität zu RIN38(VPAC₁). Die Position 16 ist bei beiden getesteten Derivaten für die Kopplung des Farbstoffmoleküls am besten geeignet. Allerdings wurde bei dem nativen VIP-Derivat eine mehr als doppelt so hohe Affinität gemessen als bei dem [Arg⁸-VIP]-Konjugat.

Im folgenden sind die Sequenzen sämtlicher VIP-Derivate aufgelistet, welche im kompetitiven Verdrängungsassay getestet wurden. Die Farbstoffmarkierung erfolgte am N-terminalen Ende der Sequenz, der Wildtyp-Peptid und das [Arg⁸]-VIP-Konjugat wurden zusätzlich jeweils an den Positionen 5 und 16 markiert.

```

wt VIP      H S D A V F T D N Y T R L R K Q M A V K K Y L N S I L N
[Trp2]-VIP  H W D A V F T D N Y T R L R K Q M A V K K Y L N S I L N
[Arg8]-VIP  H W D A V F T R N Y T R L R K Q M A V K K Y L N S I L N
[Arg11]-VIP H W D A V F T D N Y R R L R K Q M A V K K Y L N S I L N
[Arg16]-VIP H W D A V F T D N Y T R L R K R M A V K K Y L N S I L N
scr VIP      L N T V N L T K V Q D A H S N I L R R D S F A Y Y M K K

```

5.4 Biologische Aktivität nach Stimulation mit VIP-Cy5-Derivaten

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität der VIP-Farbstoff-Konjugate wurde die cAMP-Produktion von HT29-Zellen bestimmt. Hierfür wurde eine Standardreihe mit ^{125}I markierten cAMP-Standards erstellt (Abb. 5.20).

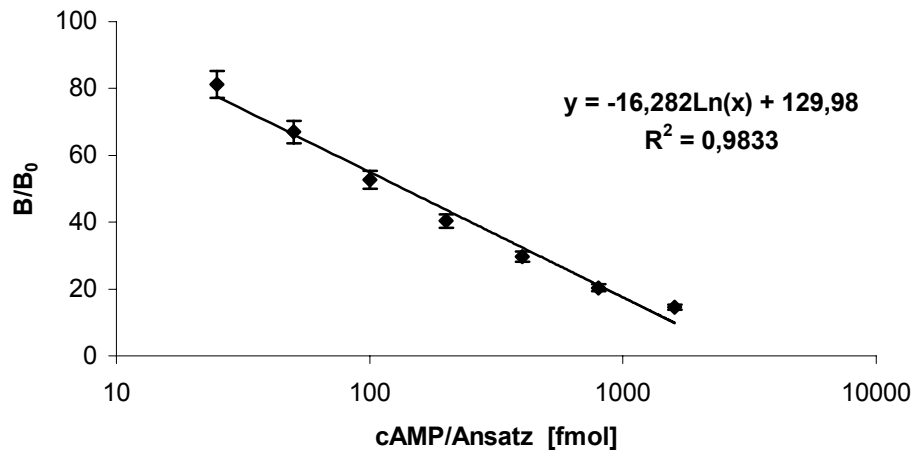


Abb. 5.20: cAMP-Standardkurve für die Bestimmung der cAMP-Produktion von HT-29-Zellen zwischen 25 – 1600 fmol

Der cAMP-Assay hat gezeigt, daß die VIP-Farbstoffkonjugate die Produktion von cAMP in HT29-Zellen induziert (Abb. 5.21). Bei nicht markiertem VIP ist schon bei der Stimulation mit der niedrigsten Peptidkonzentration eine sehr hohe cAMP-Produktion zu beobachten, welche mit zunehmender Konzentration stark anstieg. Bei der höchsten eingesetzten VIP-Konzentration ist der cAMP-Gehalt ca. 30 mal so hoch wie bei dem durch die Cy5-markierten VIP-Derivate produzierte cAMP. Bei den VIP-Cy5-Konjugaten scheint die Kopplung des Farbstoffes an die Position 16 einen positiven Einfluß auf die cAMP-Produktion zu haben. N-terminal markiertes natives VIP hatte eine kaum merkliche Induktion der cAMP-Produktion zur Folge, während an Position 16 markiertes natives VIP- und $[\text{Arg}^8]$ -VIP-Derivat die höchste cAMP-Produktion aufwiesen.

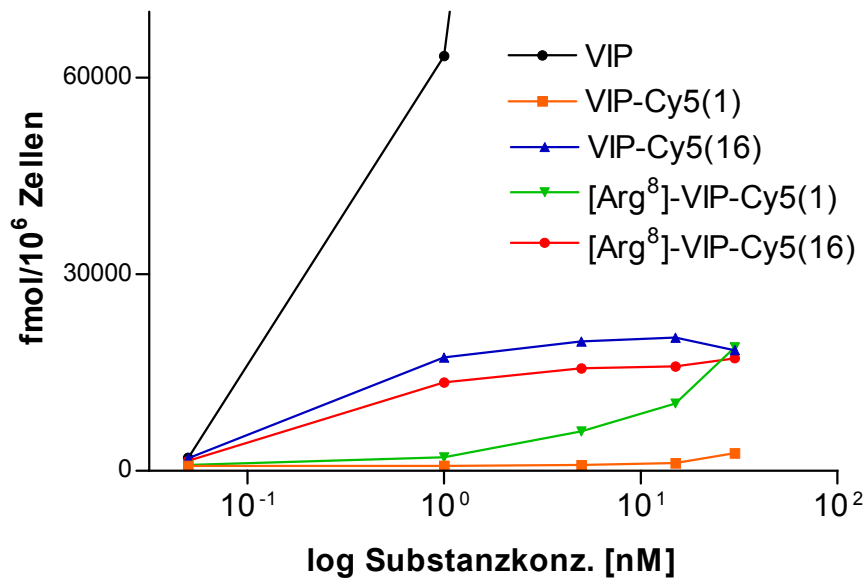


Abb. 5.21: cAMP-Produktion von HT29-Zellen nach Inkubation mit nicht markiertem VIP und unterschiedlichen VIP-Cy5-Konjugaten

5.5 Metabolische Stabilität in Rattenleberextrakt

Für die Untersuchung der Stabilität der VIP-Derivate wurde ein *In vitro*-Testsystem etabliert, welches die Inkubation der Substanzen in einem enzymatischen Cocktail mit anschließender HPLC-Analyse erlaubt. Zur Gewinnung eines solchen Enzymgemisches wurde homogenisierte Rattenleber extrahiert und mit Hilfe einer BSA-Standardeichkurve (Abb. 5.22) die Proteinkonzentration des Extraktes bestimmt.

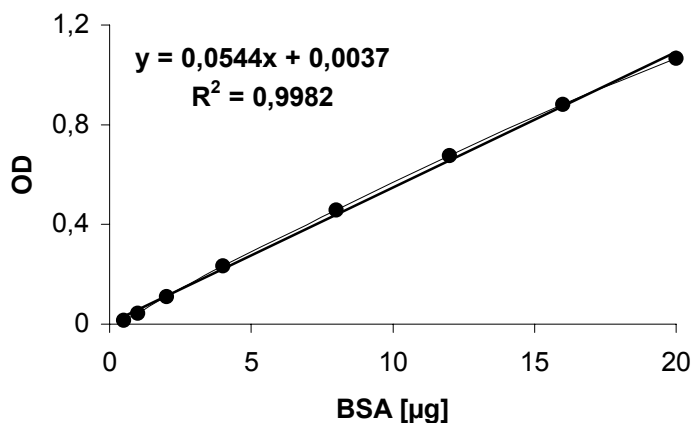


Abb. 5.22: Standardeichreihe zur Bestimmung des Proteingehaltes von Leberextrakt mit einer BSA-Standardkonzentration zwischen 0,5 und 20 μg

Verdünnung	OD bei 595 nm	Protein [µg]	Protein in Ausgangslsg. [mg/ml]
1:1000	0,432	7,873	9,84
1:1000	0,364	6,623	8,28
1:1000	0,390	7,101	8,88
1:1000	0,417	7,597	9,50

Tabelle 5.4: Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes in Rattenleberhomogenat

Es konnte ein Leberextrakt mit einer Konzentration von ca. 9 mg/ml gewonnen werden, in welcher die VIP-Farbstoff-Konjugate mit einer Konzentration von 125 µM bei 37 °C inkubiert wurden. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben entnommen und sofort eingefroren. Später wurden diese Proben aufgetaut und mittels HPLC analysiert. Abb. 5.23 zeigt beispielhaft ein HPLC-Diagramm eines VIP-Derivates zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten.

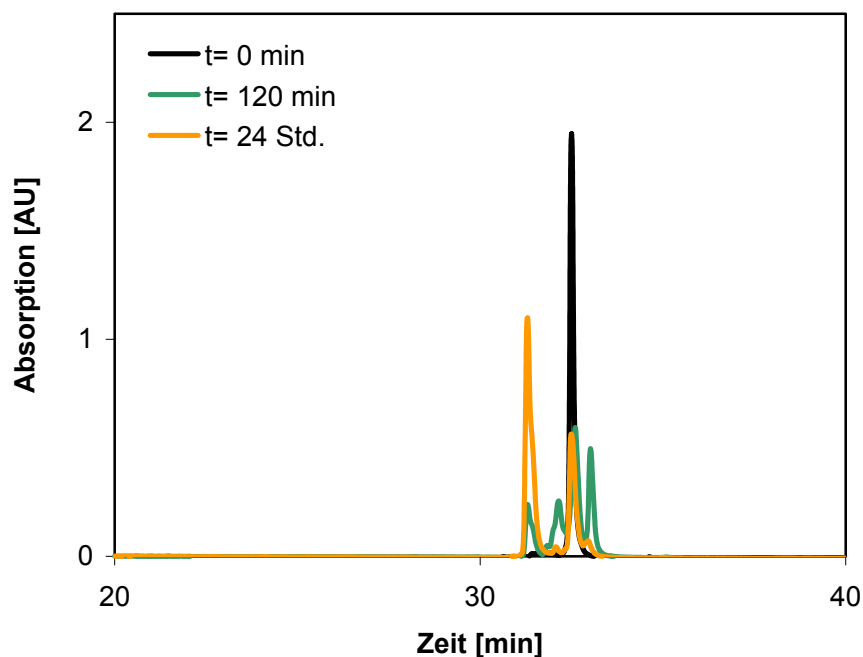


Abb. 5.23: Proteolytischer Abbau eines fluoreszenzmarkierten VIP-Konjugates in Rattenleberhomogenat am Beispiel von VIP-Cy5[1]. Dargestellt sind HPLC-Chromatogramme, welche bei 650 nm ermittelt wurden.

Der Gehalt an Ausgangssubstanz wurde bestimmt und als prozentualer Anteil im Gesamtgemisch über der Inkubationszeit aufgetragen. Als Zersetzungsprodukte wurden eine Vielzahl von Verbindungen mittels HPLC identifiziert, wodurch der genaue Peak des Ausgangsproduktes oft schwer zu verfolgen war.

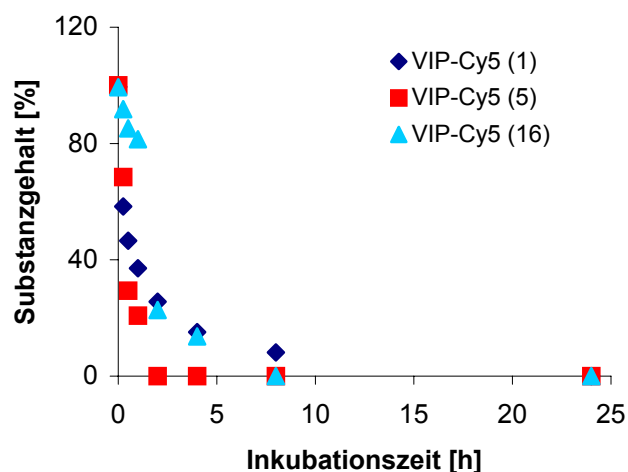


Abb. 5.24: Stabilität der Wildtyp-VIP-Konjugate mit unterschiedlichen Positionen des Cy5-Farbstoffes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

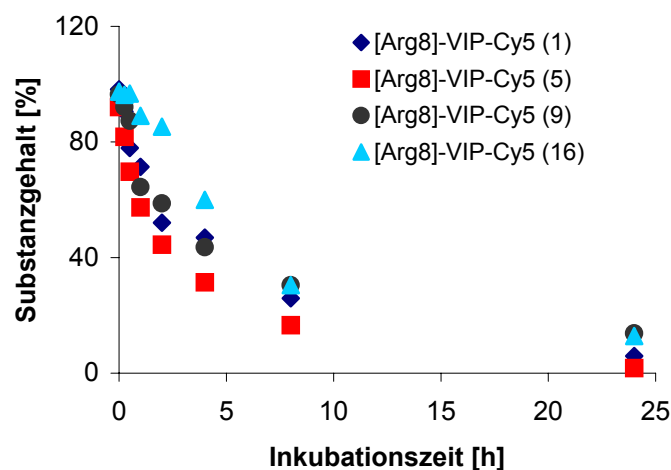


Abb. 5.25: Stabilität des [Arg⁸]-VIP-Analogon mit unterschiedlichen Positionen des Cy5-Farbstoffes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Es konnte gezeigt werden, daß in enzymatisch aktivem Medium eine Degradation der Konjugate erfolgt. Abb. 5.24 zeigt den Degradationsverlauf von Wildtyp-VIP-Derivaten mit unterschiedlichen Farbstoffpositionen. Die HPLC-Diagramme des VIP-Cy5(8) waren für eine vernünftige Auswertung ungeeignet und werden deshalb hier nicht gezeigt. VIP-Cy5(5) wurde am schnellsten proteolytisch abgebaut, während VIP-Cy5(1) und VIP-Cy5(16) eine leicht höhere Stabilität in Rattenleberextrakt aufwiesen. Mit Hilfe der Substitution von Asn⁸ gegen Arginin konnte die Stabilität der VIP-Cy5-Derivate erhöht werden. Alle Peptide zeigten gegenüber den Wildtyp-Peptiden eine höhere Stabilität in Rattenleberextrakt, wobei die Kopplung von Cy5 an Position 5 des gekoppelten Farbstoffmoleküls erneut die schnellste Degradation aller hier untersuchten Derivate bewirkte. In Abbildung 5.25 ist der Vergleich der Wildtyp-Derivate und dem [Arg⁸]-VIP-Analogon dargestellt, welche zum einen N-terminal mit Cy5 und zum anderen an Position 16 farbstoffmarkiert waren.

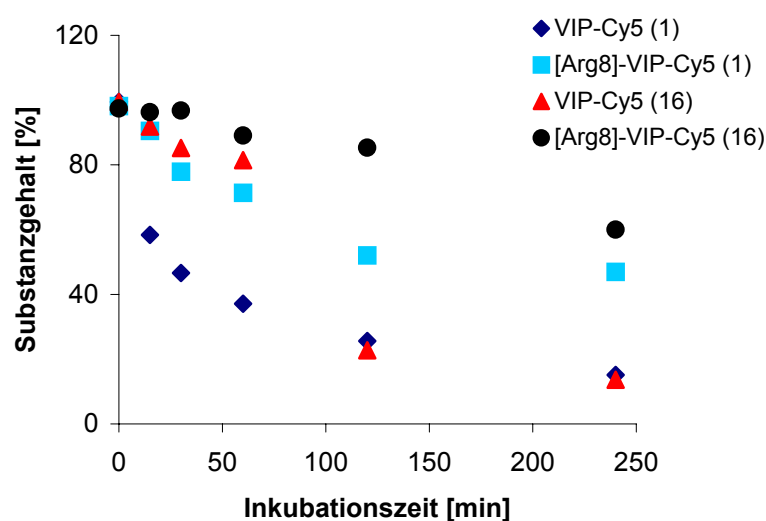


Abb. 5.26: Metabolische Stabilität des Wildtyp-VIP- und [Arg⁸]-VIP-Konjugates mit jeweils N-terminal und an Position 16 markiertem Cy5-Farbstoff im Inkubationszeitraum von 4 h

Bei dem Vergleich des Wildtyp-VIP- und [Arg⁸]-VIP-Konjugates (Abb. 5.26) erkennt man deutlich den Stabilitätsgewinn, der mit der Substitution an Position 8 erreicht worden ist. Während 50% des N-terminal markierten Wildtyp-VIP-Konjugates schon nach ca. 20 min. abgebaut wurden, sind 50% des gleichartig markierten [Arg⁸]-VIP-Derivates noch nach 4 h vorhanden. Die Farbstoffposition 16 zeigte gegenüber der N-terminalen Verknüpfung keine bedeutenden Vorteile hinsichtlich der Stabilität.

5.6 In vivo Imaging

Da das [Arg⁸]-VIP-Analogon im Stabilitätsversuch in Rattenleberextrakt eine höhere Stabilität gegenüber proteolytischer Degradation gezeigt hat, sollte dieses Konjugat weiterhin im Tierversuch mit tumortragenden Nacktmäusen untersucht werden. Als Kontrolle wurden natives und „scrambled“ VIP-Derivate herangezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy7 weist gegenüber Cy5 eine höhere Eindringtiefe ins Gewebe auf, so daß für die Tierversuche Cy7 an das N-terminale Ende der Konjugate gekoppelt wurde. Den Mäusen wurden RIN38(VPAC₁)-Zellen in die rechte abdominale Flanke inokuliert. Um eine Autofluoreszenz der Versuchstiere zu vermeiden, wurden die Mäuse mit Niedrig-Pheophorbidfutter gefüttert. Nach ca. 10 Tagen hatten die Tumore die gewünschte Größe (Tab. 5.5) erreicht und konnten für den Imagingversuch eingesetzt werden.

Tier Nr.	Substanz	Gewicht [g]	Ø Tumorgroße [cm]
1	wt VIP	25,1	0,25 x 0,25
2	wt VIP	29,3	0,3 x 0,3
3	wt VIP	28,5	0,2 x 0,2
4	wt VIP	25,5	0,2 x 0,2
5	[Arg ⁸]-VIP	28,9	0,3 x 0,3
6	[Arg ⁸]-VIP	25,7	0,16 x 0,2
7	[Arg ⁸]-VIP	26,8	0,2 x 0,2
8	[Arg ⁸]-VIP	28,1	0,2 x 0,15
9	scr VIP	25,2	0,33 x 0,35
10	scr VIP	27,4	0,2 x 0,2
11	scr VIP	25,2	0,2 x 0,25
12	scr VIP	27,9	0,25 x 0,12

Tabelle 5.5: Bestimmung von Gewicht der Mäuse und deren Tumorgroße für die Untersuchung von N-terminal markierten VIP-Cy7-Konjugaten



Abb. 5.27: Nacktmaus mit inokulierten VPAC₁-überexprimierenden Tumor in der rechten VIP-Cy7-Konjugaten abdominalen Flanke

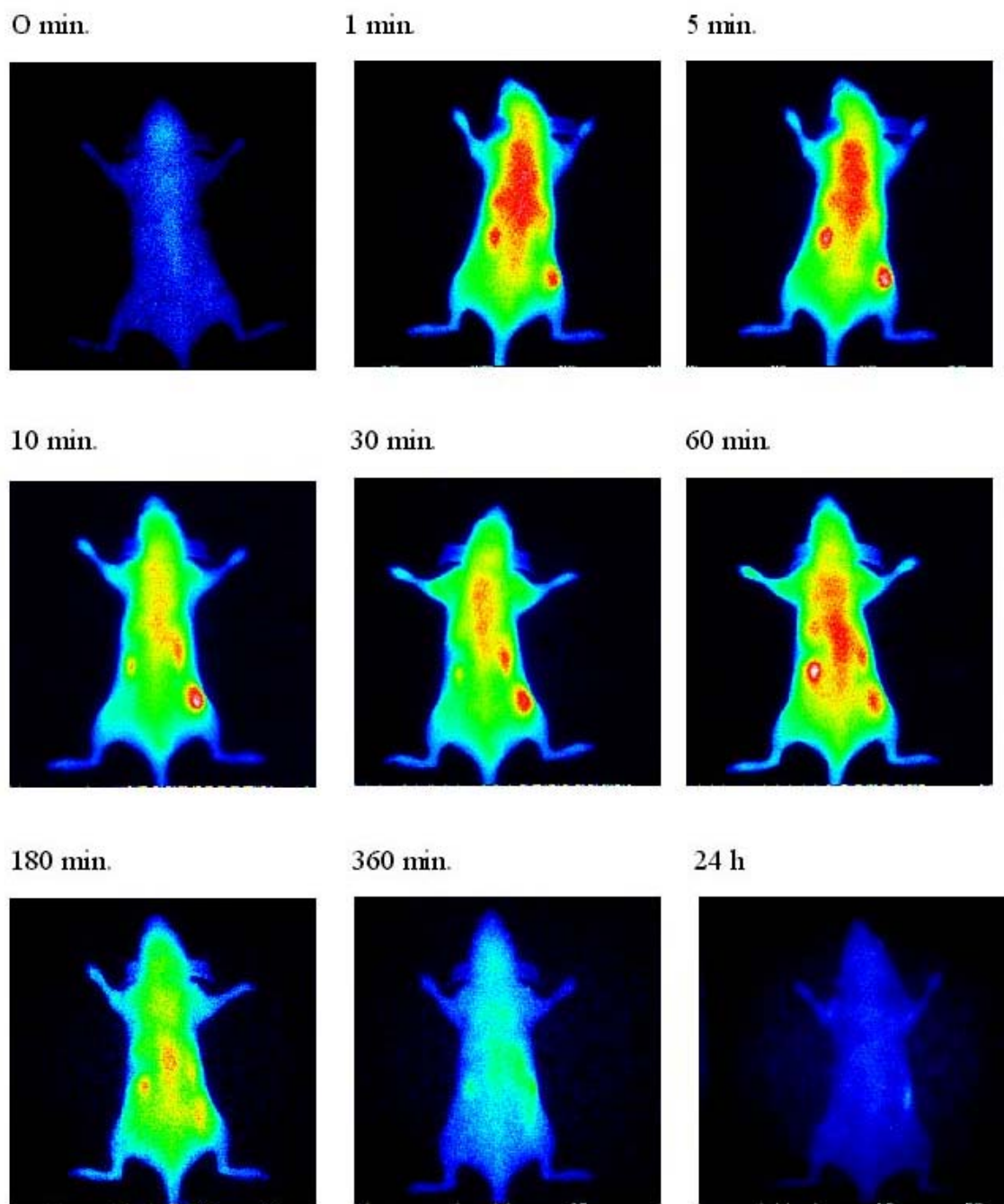


Abb. 5.28: *In vivo* Fluoreszenzbildgebung nach Applikation des Derivates VIP-Cy5(1)

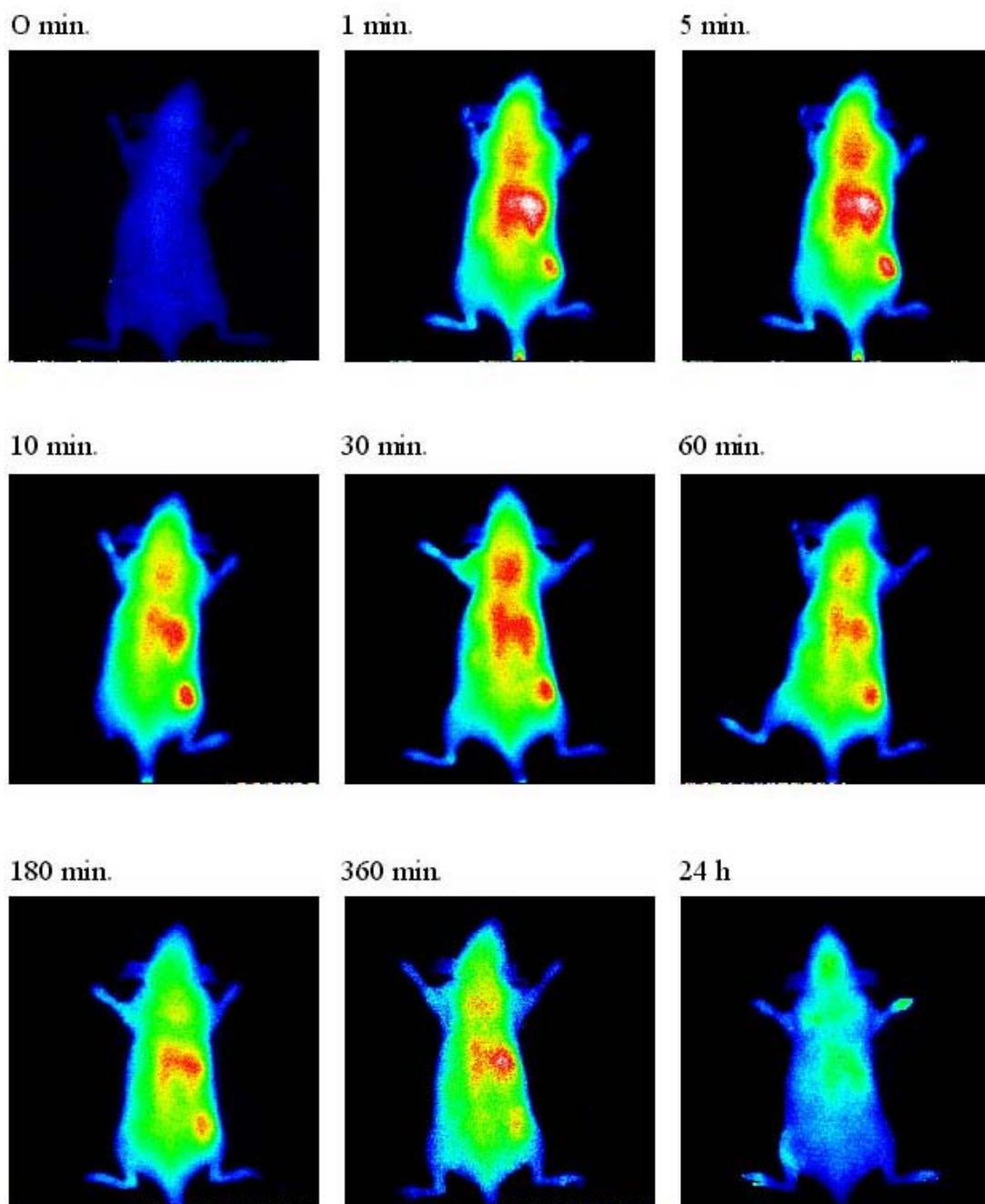


Abb. 5.29: *In vivo* Fluoreszenzbildgebung nach Applikation des Derivates [Arg⁸]-VIP-Cy5(1)

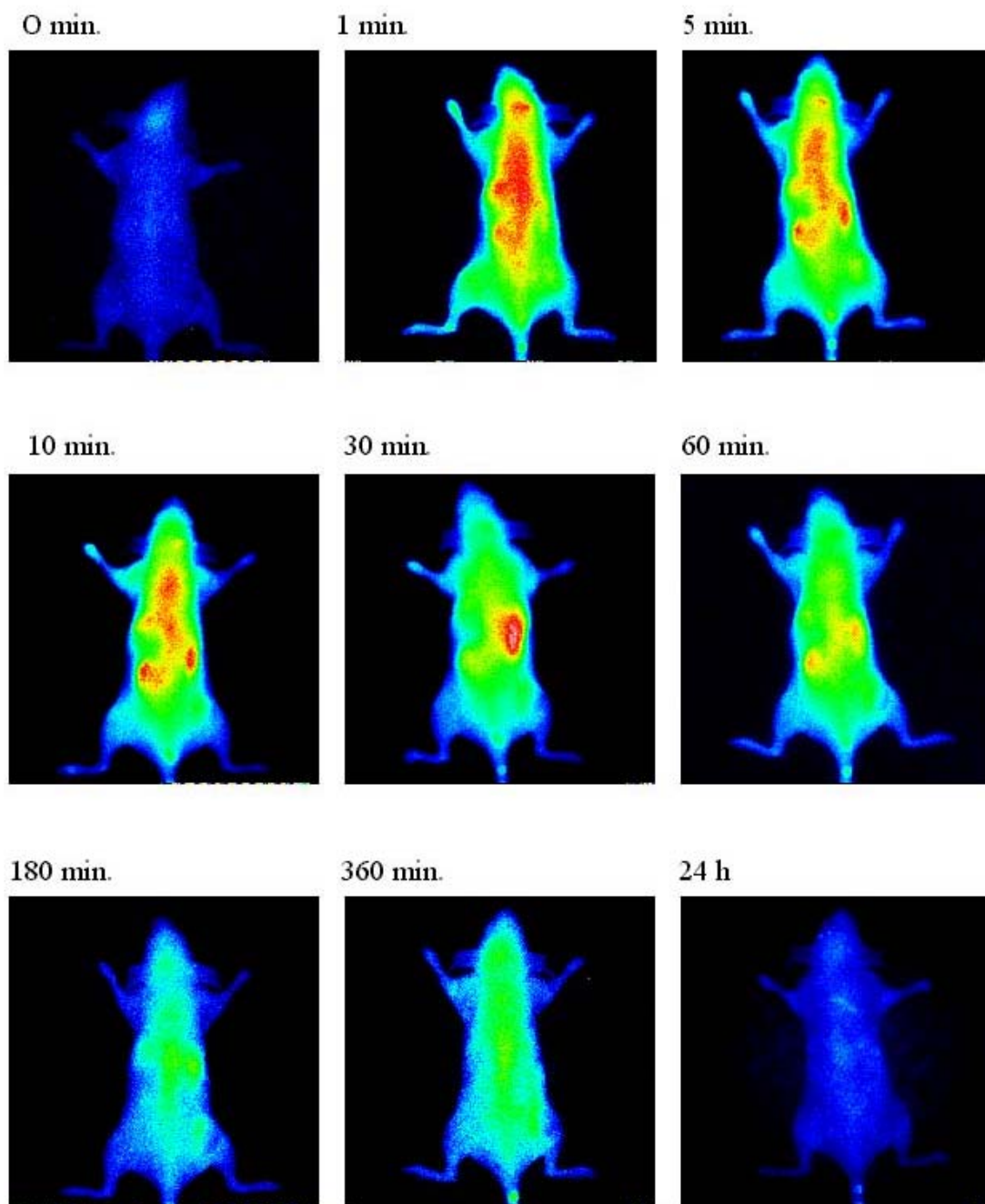


Abb. 5.30: *In vivo* Fluoreszenzbildgebung nach Applikation der Negativkontrolle scr-VIP-Cy5(1)

Damit die Tiere sich bei den Fluoreszenzaufnahmen nicht bewegen konnten, wurden sie direkt vor dem Versuch narkotisiert, um so verwackelte Bilder zu vermeiden. Den Mäusen wurden die VIP-Derivate mit einer Dosis von 0,02 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht in die Schwanzvene injiziert. Es wurden Fluoreszenzaufnahmen vor Applikation und zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 24 h nach Applikation der Substanzen gemacht.

Die Abbildungen 5.28, 5.29 und 5.30 zeigen die vollständigen Zeitverläufe der drei verschiedenen applizierten VIP-Konjugate am Beispiel von jeweils einem Tier.

Die *in vivo* Imaging-Bilder der Mäuse, denen wtVIP-Cy7(1) injiziert wurde, zeigten eine Anreicherung des markierten Peptids im Tumor. Das Peptid wird sehr schnell im Tumor akkumuliert und man kann eine klare Abgrenzung zum Normalgewebe erkennen. Bei der Applikation von $[\text{Arg}^8]$ -VIP-Cy7(1) kann man ebenfalls einen starken Tumorkontrast beobachten, welcher auch längere Zeit nach Applikation anhält. Im Gegensatz zum wtVIP-Cy7(1) und $[\text{Arg}^8]$ -VIP-Cy7(1) zeigt scrVIP-Cy7(1) ein unspezifisches Fluoreszenzsignal im Körper der Maus. Der Tumor wurde jedoch nicht markiert. Bei allen Tieren kann man ein Fluoreszenzsignal in den Lungen, im Bauchraum vor allem in den Nieren sehen.

Um die verschiedenen gemessenen Substanzen im Tiermodell zu vergleichen, wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Mäuse wie bei den Abbildungen 5.28 - 5.30 mit Hilfe des WinSpec1.6.2-Programms normiert. Einen eindeutigeren Vergleich erhält man jedoch, wenn man die Kontraste berechnet, die sich aus den Fluoreszenzsignalen des Tumors auf der rechten Flanke der Maus und den Fluoreszenzsignalen des Normalgewebes auf der kontralateralen Seite ermitteln lassen. Die Kontrastverläufe der jeweiligen Substanzen sind im folgenden gezeigt.

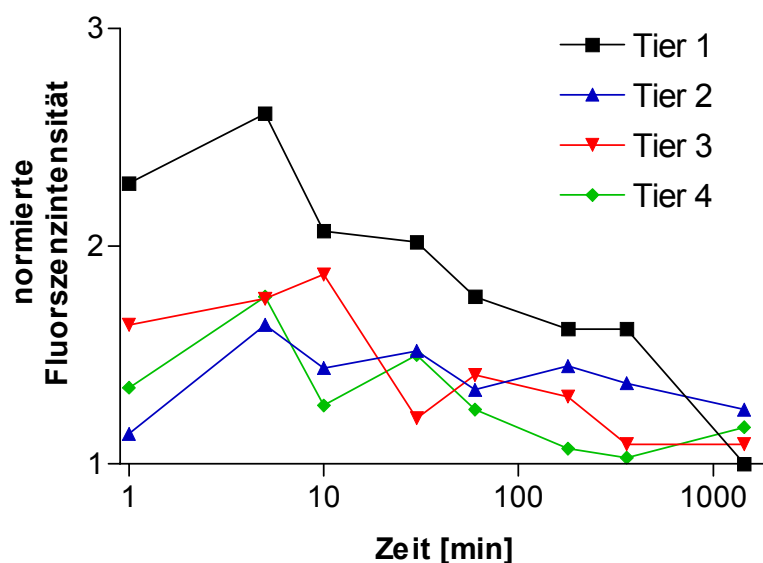


Abb. 5.31: Kontrastverläufe von wt VIP-Cy7(1) in n = 4 Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit

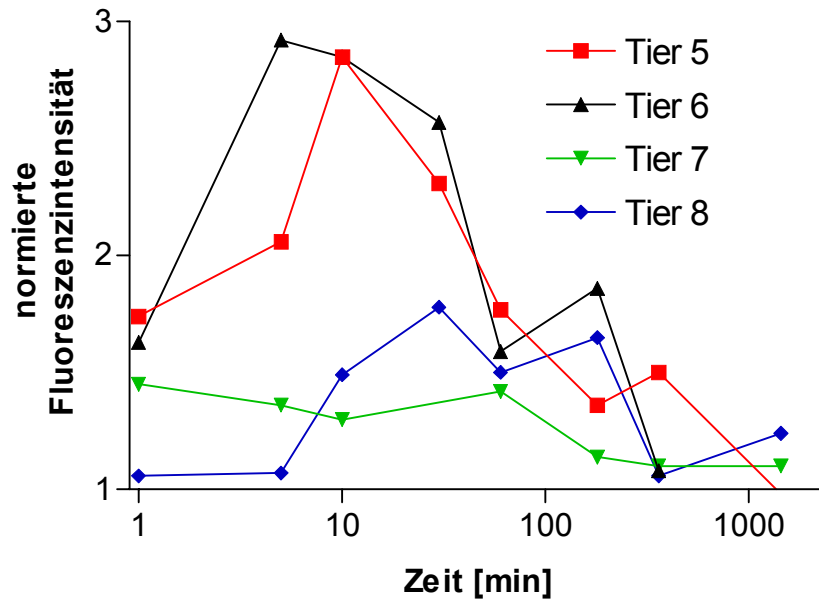


Abb. 5.32: Kontrastverläufe von [Arg⁸]-VIP-Cy7(1) in n = 4 Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit

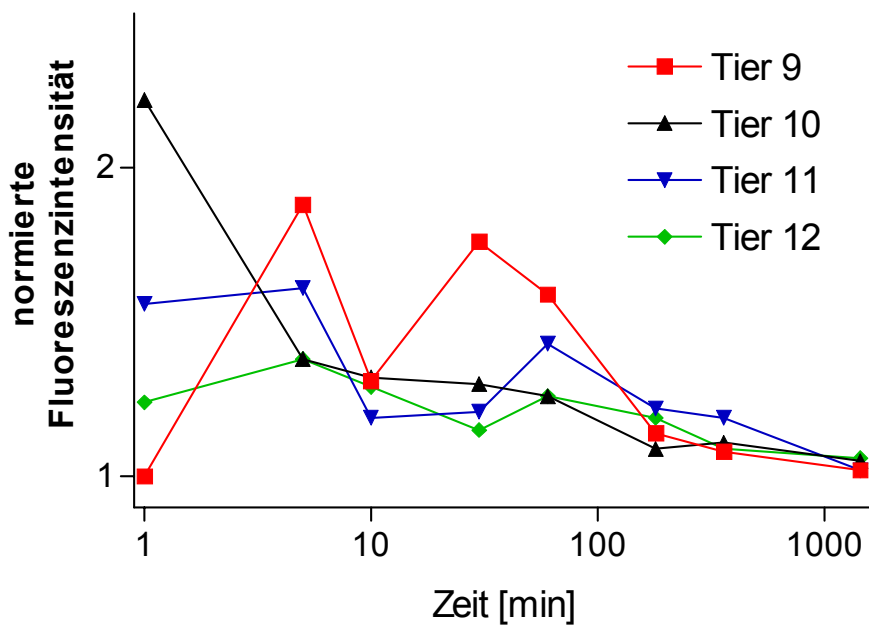


Abb. 5.33: Kontrastverläufe von scr VIP-Cy7(1) in n = 4 Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit

Die Kontrastverläufe demonstrieren, daß bei den unterschiedlichen untersuchten VIP-Derivaten starke Abweichungen innerhalb der Versuchsgruppen zustande gekommen sind. Zum Teil weichen die Tiere, welche dasselbe Präparat injiziert bekommen haben, stark voneinander ab. Bei den Tieren 1 – 4, denen wtVIP-Cy7(1) verabreicht wurde, kann man erkennen, daß alle Tiere einen sehr ähnlichen Kontrastverlauf haben, wobei bei dem Tier 1 der Verlauf insgesamt

wesentlich höher ist. Das Maximum der Fluoreszenzsignale ist bei 5 min. erreicht, danach nimmt die Intensität der Fluoreszenz wieder ab. Bei der Applikation von $[\text{Arg}^8]\text{-Cy7(1)}$ ist auffällig, daß die 4 Tiere sich in zwei Gruppen teilen. Tier 5 und 6 zeigen einen ähnlich hohen Kontrastverlauf, während Tier 7 und 8 einen niedrigeren Verlauf aufweisen, der sich jedoch auch wieder stark ähnelt. Allgemein kann man sagen, daß die Anflutung des Peptids in den Tumoren im Gegensatz zum Wildtyp-VIP-Cy7(1) wesentlich langsamer und im höheren Bereich verläuft. Die Berechnung des Kontrastes von Tier 7 zum Zeitpunkt 30 min. nach Applikation war nicht durchführbar, da das Tier offensichtlich nicht ausreichend narkotisiert war und sich während der Aufnahme bewegt hat. Eine Aufnahme von Tier 5 nach 24 h war nicht möglich, da das Tier zu diesem Zeitpunkt bereits tot war. Bei den Tieren, die das scrVIP-Cy7(1)-Derivat verabreicht bekommen haben, ist kaum eine ähnliche Tendenz der Kontrastverläufe festzustellen, außer daß die Fluoreszenzintensitäten im Gegensatz zu den beiden anderen VIP-Konjugaten wesentlich niedriger sind.

Die starke Abweichung, die unter den Tieren auftritt, hängt mit den Tumoren zusammen. Je nachdem, in welchem nekrotischen Stadium sich der Tumor befindet und auch die Versorgung mit Blutgefäßen gewährleistet ist, können die Peptidliganden zum Tumor gelangen. Diese Parameter konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden, so daß für einen direkten Vergleich der Kontrastverläufe der unterschiedlichen Tiere einfach der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Substanzgruppen gebildet wurde (Abb. 5.34).

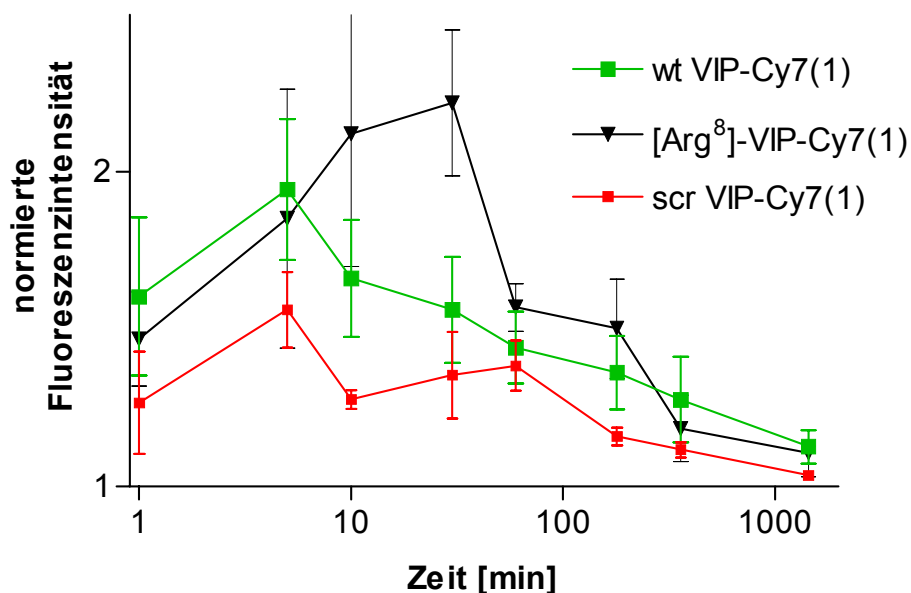


Abb. 5.34: Vergleich der Kontrastverläufe von wtVIP-Cy7(1), $[\text{Arg}^8]\text{-VIP-Cy7(1)}$ und scrVIP-Cy7(1). Es ist jeweils der Mittelwert von 4 Tieren dargestellt.

Beim direkten Vergleich kann man deutlich erkennen, daß die Kurve des scr VIP-Cy7(1) niedrigere Fluoreszenzkontraste erzeugt als wt VIP-Cy7(1) und [Arg⁸]-VIP-Cy7(1). Bei wt VIP-Cy7(1) reicherte sich der Ligand schnell im Tumor an, wobei das Maximum bei 5 min. nach Applikation erreicht ist. Danach nimmt der Kontrast kontinuierlich ab. Das [Arg⁸]-VIP-Cy7(1)-Analogon akkumuliert langsamer im Tumor und erreicht erst bei 30 min. nach Verabreichung das Maximum, welches eindeutig höher ist als das mit dem wt VIP-Cy7(1) erreichte Maximum. Nach 30 min. allerdings nimmt die Fluoreszenzintensität von [Arg⁸]-VIP-Cy7(1) stark ab.

6. Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Aminosäurepositionen der VIP-Sequenz für die Rezeptor-Bindung an VPAC₁ essentiell sind, welche Aminosäurepositionen für diese Bindung nicht relevant sind und so hinsichtlich der Stabilisierung des Liganden modifiziert werden können. Die Stabilisierung von VIP ist für den Einsatz in der Tumordiagnostik nötig, wobei die Visualisierung des Peptids über einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff erfolgen sollte. Hierfür wurde eine Synthese-Strategie entwickelt, bei welcher die VIP-Derivate unter Erhalt des Fluoreszenzfarbstoffes nach Beendigung der Synthese unter milden Bedingungen von der Membran abgespalten wurden (Licha *et al.*, 2000a). Diese Methode erlaubt die Herstellung von Peptiden in ausreichender Reinheit und Menge. Auch bei der Synthese längerer Sequenzen wie bei dem 28meren VIP waren diese Kriterien hinreichend. Chadker & Rattan haben gezeigt, daß die vollständige 28mere VIP-Sequenz für die Bindung an VPAC₁ und die Aktivierung der nachfolgenden Signalkette notwendig ist (Chadker & Rattan, 1993). Somit ist anzunehmen, daß sich das Auftreten von Abbruchsequenzen für das Screening der VIP-Derivate nicht störend auswirkt, da verkürzte VIP-Peptide nicht an den Rezeptor binden.

6.1 Substitutionsanalyse von VIP-Cy5(1)

Die Charakterisierung des VIP wurde mit Hilfe einer vollständigen Substitutionsanalyse durchgeführt, bei welcher jede Position des 28meren Peptid durch alle übrigen 19 L-Aminosäuren substituiert wurde und so 533 VIP-Derivate resultierten. Da der Farbstoff gegenüber dem in der Synthese zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verwendeten Piperidin nicht stabil ist, wurde das Farbstoffmolekül erst nach Beendigung der Synthese an den N-Terminus der VIP-Derivate gekoppelt.

Die FACS-Untersuchungen der N-terminal mit dem Farbstoff Cy5 markierten Derivate im Zellassay führte zu einem Muster (Abb. 5.10), welches Hinweise über die Relevanz jeder einzelnen Aminosäure bezüglich der Bindung an RIN38(VPAC₁)-Zellen gibt. Das Muster zeigt deutlich die Unterschiede zwischen den für die Zellbindung wichtigen und unwichtigen Aminosäurepositionen, wobei nicht differenziert werden kann, ob die Aminosäuren einen

direkten Kontakt mit dem Rezeptor eingehen oder für die Struktur des VIPs am Rezeptor essentiell sind. Solange es jedoch nicht möglich ist, Strukturanalysen von VIP im rezeptorgebundenen Zustand durchzuführen, gibt es keinen direkten Nachweis für die „wirkliche“ Funktion jeder einzelnen Aminosäure.

Bei der Substitutionsanalyse von VIP wurde jede Position der Sequenz durch die 19 übrigen Aminosäuren ausgetauscht. In der Darstellung der Substitutionsanalyse erkennt man in der Cysteinspalte, daß die Substitution mit Cystein an den meisten Positionen erlaubt ist. Es wäre möglich, daß sich zwischen den Thiolgruppen der Cysteine Disulfidbrücken ausbilden und die Peptide in dimerisierter Form an den Rezeptor binden, welches in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht überprüft wurde. Es wäre aber denkbar, die Dimerisierung von Cy5-markierten VIP-Molekülen absichtlich und kontrolliert durchzuführen, da auf diese Weise vielleicht ein erhöhtes Fluoreszenzsignal erwartet werden kann. Die Substitution mit Cystein kann zudem Informationen darüber geben, an welchen Positionen möglicherweise Farbstoffmoleküle über die Thiolgruppe des Cysteins gekoppelt werden können. Bei der gängigen Farbstoffkopplung wird vor der Schutzgruppenabspaltung der Farbstoff über eine Säureamidbindung an eine Aminogruppe, im Fall der Substitutionsanalyse an die N-terminale Aminogruppe gekoppelt. Der Vorteil der alternativen Kopplungsmethode über einen Cysteinrest besteht darin, daß die selektive Schutzgruppenabspaltung und die Kopplung des Farbstoffes, welcher hierfür entweder Bromacetyl- oder Maleimidofunktionalitäten besitzen sollte (Schelté *et al.*, 2000), sehr einfach und sicher ist. Verfolgt man diese Strategie, kann der Farbstoff auch erst nach der Schutzgruppenabspaltung an das Peptid gebunden werden, so daß auf eine orthogonale Schutzgruppenchemie vollständig verzichtet werden kann.

In der Darstellung der Substitutionsanalyse (Abb. 5.10) kann man in der Spalte von Prolin erkennen, daß der Austausch durch diese Aminosäure bei fast keiner Position der VIP-Sequenz möglich ist. Auch Glycin ist bei sehr vielen Positionen, vor allem im mittleren Abschnitt der Sequenz, nicht zugelassen. Dies liefert Hinweise, daß VIP eine α -helikale Struktur am Rezeptor einnimmt, da Prolin erfahrungsgemäß einen helix-brechenden Charakter hat. Glycin ist ebenfalls dafür bekannt, Helices zu destabilisieren, da Glycin aufgrund seiner Struktur bezüglich der Konformation sehr flexibel und nicht in der Lage ist, hydrophobe Stabilisierungen auszuführen (Blaber *et al.*, 1993). Die Vermutung, daß das VIP-Molekül in dem Rezeptor-Liganden-Komplex eine α -helikale Konformation einnimmt, wird auch durch verschiedene Literaturdaten bekräftigt. Es wurden Strukturuntersuchungen von VIP in Lösung mittels NMR und CD durchgeführt (Theriault *et al.*, 1991, Wray *et al.*, 1998, Fry *et al.*, 1989) und ebenfalls helikale Strukturen des VIP ermittelt. In unserer Gruppe wurden „Molecular Modelling-Studien von VIP und VIP-

Cy5(1) in freier Form durchgeführt, bei denen gezeigt wurde, daß große Bereiche des Peptids eine helikale Konformation eingehen (Abb. 6.1).

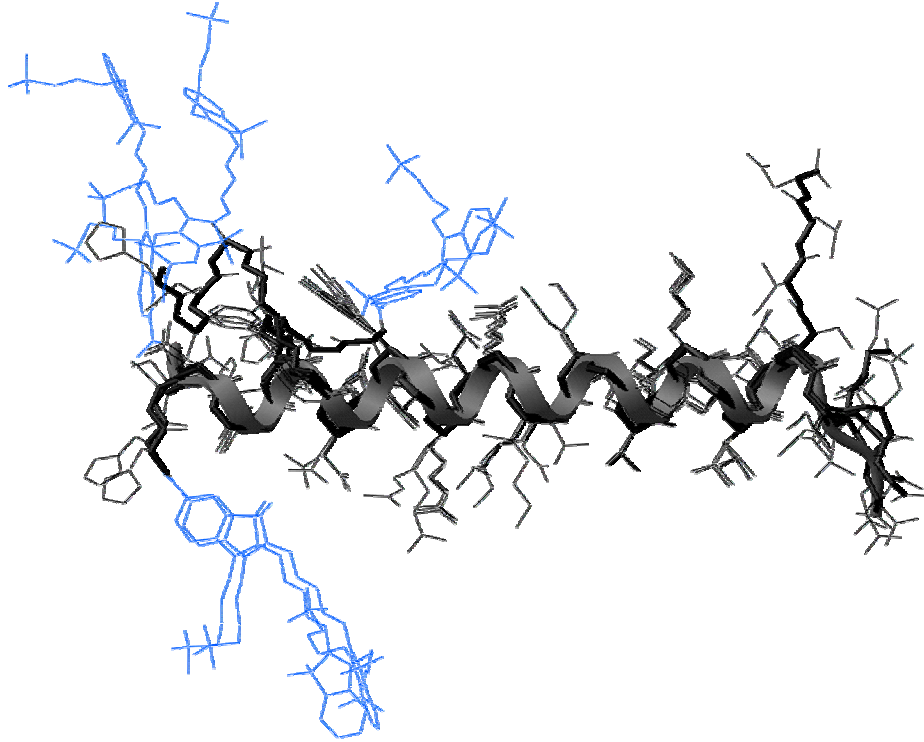


Abb. 6.1: Überlagerung der Strukturen niedrigster Energie von 5 Faltungssimulationen. Die Rückgratatome erscheinen schwarz (fett), das Cy5-Molekül blau und die Struktur mit der niedrigsten Energie ist grau dargestellt. Für die Konformationsberechnungen wurde das Software-Paket ICM (MolSoft LLC, La Jolla, USA) (Abagyan *et al.*, 1994) verwendet.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur (Frishman & Argos, 1996) ergab eine α -Helix zwischen Tyr¹⁰ und Ser²⁵, welche mit Hilfe von 5 unabhängigen Computersimulationen bestätigt werden konnte. Hierbei wurde in 66 % aller Strukturen niedriger Energie eine helikale Konformation zwischen Asp⁸ und Leu²³ ermittelt. In diesem Bereich befinden sich auch die Schlüsselaminosäuren für die Bindung an VPAC₁-überexprimierende Zellen. Im N-terminalen Bereich konnte in ca. 15 % der niedrigenergetischen Strukturen eine Helix zwischen Asp³ und Phe⁶ errechnet werden, wobei Thr⁷ diese kleinere helikale Untereinheit von dem großen helikalen Abschnitt trennt. Die Simulation von VIP ohne den N-terminal gekoppelten Farbstoff resultiert in virtuell identischen Konformationseigenschaften (Abb. 6.2). Es scheint, daß die

Kopplung des Farbstoffmoleküls an das N-terminale Ende der VIP-Sequenz kaum Beeinträchtigungen der helikalen Struktur zur Folge hat.

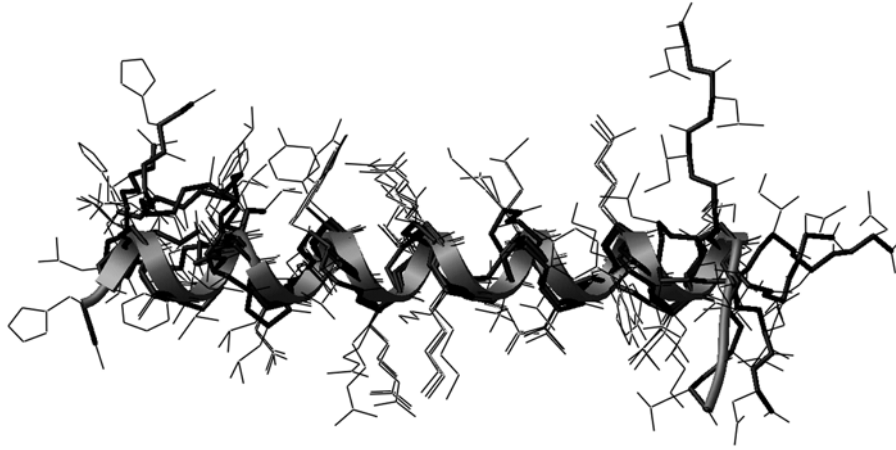


Abb. 6.2: Überlagerung der Strukturen niedrigster Energie von 5 Faltungssimulationen. Die Rückgratratome sind schwarz (fett) und die Struktur mit der niedrigsten Energie ist grau dargestellt.

In der Darstellung der elektrostatischen Ladungsverteilung des VIP-Farbstoff-Moleküls kann man deutlich die hohe Anzahl der positiven Ladungen erkennen (Abb. 6.3). Die Ergebnisse der Substitutionsanalyse des farbstoffmarkierten VIP haben ergeben, daß negativ geladene Aminosäuren nur an den Positionen Asp³ und Asp⁸ geduldet werden, bei denen in der nativen Sequenz schon eine negativ geladene Aminosäure auftritt. Positiv geladene Aminosäuren werden eher bevorzugt, wobei das Peptid mit den Aminosäurepositionen Arg¹², Arg¹⁴, Lys¹⁵, Lys²⁰ und Lys²¹ schon stark positiv geladen ist.

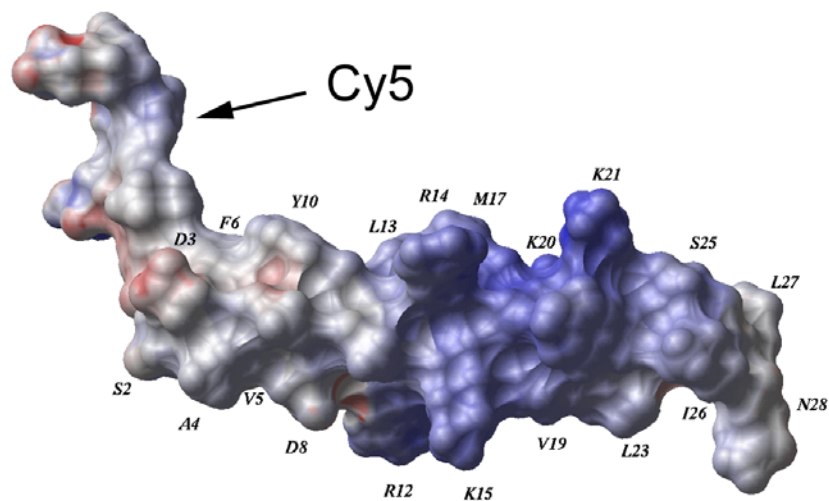


Abb. 6.3: Elektrostatische Ladungsverteilung des nativen VIP-Moleküls mit N-terminal markierten Cy5-Farbstoff mit dem Software-Paket ICM (MolSoft LLC, La Jolla, USA). Positive Ladungen sind blau und negative Ladungen rot gefärbt.

In neuesten Studien von Lins *et al.* wurden Mutationen an putativen Bindungsstellen des Rezeptors durchgeführt und mittels „Molecular Modelling“ die erste partielle 3D-Struktur der VIP-bindenden Domäne konstituiert (Lins *et al.*, 2001). Diese 3D-Struktur befindet sich im extrazellulären N-terminalen Bereich des Rezeptors und weist eine negativ geladene Vertiefung auf, in der die Aminosäuren Glu³⁶ und Asp⁶⁸ eingebettet sind. Darüber liegt eine hydrophobe Domäne mit 3 Tryptophanresten (Trp⁶⁷, Trp⁷³ und Trp¹¹⁰) (Nicole *et al.*, 2000a, Nicole *et al.*, 2000b). Die Autoren haben gezeigt, daß der Austausch dieser Aminosäuren mit Alanin die Bindung von nativem VIP drastisch reduziert. Dies wurde auch für die Positionen Pro⁷⁴, Pro⁸⁷, Phe⁹⁰ und Gly¹⁰⁹ festgestellt. Lins *et al.* vermuten, daß die negativ geladenen Aminosäuren im Rezeptor mit den positiven Aminosäuren des Liganden einen direkten Kontakt eingehen oder eine starke Anziehung der Aminosäuren zueinander stattfindet (Lins *et al.*, 2001). Die Unverträglichkeit negativ geladener Aminosäuren, welche bei der Substitutionsanalyse gefunden wurden, könnte die Anziehung zwischen Rezeptor und Ligand mindern, so daß der Austausch mit diesen Aminosäuren zu einer verringerten Zellbindung führt. Die Substitution mit positiv geladenen Aminosäuren kann die Anziehung jedoch verstärken und somit die Bindung zum Rezeptor erhöhen, welches auch die hohe Toleranz gegenüber den positiv geladenen Aminosäuren in der Substitutionsanalyse erklären würde. Da die für die VIP-Bindung essentiellen negativ geladenen Aminosäuren des Rezeptor in einer Vertiefung liegen, wird angenommen, daß die Bindung des Liganden eine dynamische strukturelle Reorganisation der Vertiefung induziert.

Einen weiteren interessanten Aspekt liefert die Substitution mit Tryptophan, die an den meisten Positionen der VIP-Sequenz möglich ist. Die physikochemisch verwandten Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin werden zwar weniger stark, aber auch bei der Mehrheit der Aminosäurepositionen geduldet. Da die bindende Domäne des VPAC₁ eine Gruppe mehrerer Tryptophane enthält, kann man annehmen, daß aromatische Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und dem Liganden stattfinden (Lins *et al.*, 2001). In der nativen Form des VIP treten 3 Aromaten (Phe⁶, Tyr¹⁰, Tyr²²) auf, welche basierend auf der Substitutionsanalyse für das Bindungsverhalten von hoher Relevanz und nur wenig substituierbar sind. Es ist möglich, daß diese Aromaten $\pi\pi$ -Interaktionen mit den Tryptophanresten des VPAC₁ eingehen. Die Substitution mit Tryptophan kann diesen Effekt noch verstärken, was eine mögliche Begründung für die hohe Toleranz der VIP-Sequenz gegenüber Tryptophan liefert.

Die Positionen Arg¹², Arg¹⁴ und Leu²³ konnten eindeutig als Schlüsselaminosäuren identifiziert werden, da an dieser Stelle nur die in der nativen Sequenz vorkommende Aminosäure zugelassen ist, um eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bindung zu erreichen. Man kann davon ausgehen, daß die Stringenz dieser Aminosäure auf der direkten Beteiligung an der Rezeptorbindung beruht. Es ist beschrieben, daß besonders der C-terminale Bereich der VIP-Sequenz für die Rezeptorbindung und Aktivierung wichtig ist (Wulff *et al.*, 1997). Dies korreliert gut mit den Ergebnissen der Substitutionsanalyse, da sich die gefundenen Schlüsselaminosäuren im C-terminalen Abschnitt befinden.

Nicole *et al.* haben kürzlich einen Alanin-Scan von VIP angefertigt, wobei jede Aminosäureposition gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Nicole *et al.*, 2000a). Die Positionen, bei denen in der nativen VIP-Sequenz schon Alanin vorhanden ist, wurden mit Glycin substituiert. Auf diese Weise entstanden 28 Alanin-/Glycin-substituierte VIP-Derivate, welche auf die Fähigkeit, radioaktiv markiertes VIP zu verdrängen, getestet wurden. Konjugate, welche ein vermindertes Verdrängungsvermögen aufwiesen, wurden zusätzlich in „Molecular Modelling-Versuchen“ hinsichtlich der Strukturänderungen überprüft. Auf der Basis dieser Studien wurde angenommen, daß die Aminosäuren His¹, Val⁵, Arg¹⁴, Lys¹⁵, Lys²¹, Leu²³ und Ile²⁶ direkt an der Rezeptorbindung beteiligt sind, da Alanin-Substitutionen zu verringerten Verdrängungen des Radioliganden führten, ohne die Struktur des Peptids zu verändern. Substitutionen an Asp³, Phe⁶, Thr⁷, Asp⁸, Tyr¹⁰, Arg¹², und Lys²⁰ dagegen zeigten beim „Molecular Modelling“ stark veränderte Strukturen und sollten deshalb nur für die Ausbildung der korrekten VIP-Struktur am Rezeptor verantwortlich sein. Zum größten Teil decken sich die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Studien, teilweise weichen die Ergebnisse von Nicole *et al.* von den hier erzielten Ergebnissen voneinander ab.

Sicherlich kann man sagen, daß eine Substitutionsanalyse ausführlichere Details über die jeweiligen einzelnen Aminosäurepositionen liefern kann als ein Alanin-Scan. Der Alanin-Scan ist eine gängige Methode für die Charakterisierung von molekularen Erkennungsmechanismen. Dabei wird jede Position eines Peptidliganden mit Alanin substituiert, was im Grunde dazu führt, daß die Seitengruppe einer bestimmten Aminosäureposition zu einer Methylgruppe reduziert wird. Auf diese Weise werden nicht-kovalente Wechselwirkungen verhindert und die Gesamtstruktur des Peptids bleibt erhalten (Holst *et al.*, 1998, Di Cera, 1998). Obwohl diese Methode nur eine relativ geringe Anzahl Peptide benötigt, ist ein Alanin-Scan für die Charakterisierung von Peptidstrukturen nicht sehr effektiv. Man erhält einen tieferen Einblick in die strukturellen Ansprüche für die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, wenn jede Aminosäureposition systematisch mit den genkodierten Aminosäuren substituiert wird. Dies bietet den Vorteil, daß der Einfluss diverser Aminosäuren, die sich in Größe und Funktion unterscheiden, bei jeder Position der Sequenz überprüft werden kann (Kramer *et al.*, 1997).

Bei der vorliegenden Arbeit wird der Vorteil der Substitutionsanalyse gegenüber dem Alanin-Scan vor allem bei Position 19 deutlich. Val¹⁹ wurde von Nicole *et al.* als eine für die Struktur und Funktion unwichtige Aminosäure definiert (Nicole *et al.*, 2000a). Der Austausch mit Alanin in der Substitutionsanalyse bestätigt dies, da hier die Zellbindung ebenfalls nur unwesentlich verringert ist. Die Substitutionsanalyse zeigt, daß bei dieser Position außer Alanin nur die Aminosäuren Isoleucin und Leucin toleriert werden. Dies wird jedoch aus den Daten des Alanin-Scan nicht ersichtlich. Somit sind an dieser Stelle nur aliphatische Aminosäuren in der VIP-Sequenz akzeptabel, welches die Relevanz dieser Position entscheidend steigert.

Weitere Differenzen bestehen auch in Aussagen über die erste Aminosäureposition der VIP-Sequenz. In den Experimenten von Nicole *et al.* erweist sich His¹ als essentiell, welches auch durch andere Daten aus der Literatur (Goossens *et al.*, 1997) aber nicht durch die hier angefertigte Substitutionsanalyse bestätigt werden kann. Da in dieser Versuchsreihe jedoch das Farbstoffmolekül an diese Position gekoppelt wurde, sollte auf eine Interpretation der Bindungsdaten für die substituierten Derivate dieser Aminosäure verzichtet werden. Auch bei Tyr²² differieren die Aussagen über die Relevanz der Aminosäuren. Nicole *et al.* fanden bei der Alanin-Substitution dieser Aminosäure keine verringerte Rezeptorbindung zu VPAC₁ (Nicole *et al.*, 2000a), während in der vorliegenden Arbeit der Austausch mit Alanin zu einem drastisch reduzierten Bindungsverhalten führte. Die Ergebnisse in der Substitutionsanalyse sind bei dieser Position in sich sehr schlüssig. Es wurde gezeigt, daß an Tyr²² nur physikochemisch ähnliche Aminosäuren, nämlich Phenylalanin und Tryptophan, zulässig sind.

Eine weitere Abweichung gegenüber dem Alanin-Scan von Nicole *et al.* (Nicole *et al.*, 2000a) tritt bei Position 8 auf. Bei der Substitution von Asn⁸ mit Alanin wird bei Nicole *et al.* die Rezeptorbindung stark eingeschränkt. In der hier angefertigten Substitutionsanalyse dagegen kann jede der natürlichen Aminosäuren außer Prolin an diese Stelle gesetzt werden. Im weiteren Versuchsverlauf wurde ein an Position 8 modifiziertes Derivat, [Arg⁸]-VIP, synthetisiert und in *in vitro* und *in vivo* Studien eingehender charakterisiert. Da bei diesen Studien mit dem [Arg⁸]-VIP-Analogon positive Ergebnisse erzielt wurden, wurde so die Bedeutungslosigkeit der Position 8 für die Bindung an VPAC₁ gefestigt.

Weitere Unterschiede konnten bei Asp³ festgestellt werden. Nicole *et al.* konnten für das an Position 3 mit Alanin substituierte Konjugat eine verminderte Rezeptorbindung bestimmen (Nicole *et al.*, 2000a). In der vollständigen Substitutionsanalyse konnte jedoch gezeigt werden, daß die Mehrzahl der Aminosäuren unter anderem auch Alanin an dieser Stelle zugelassen werden.

Ein ähnliches Phänomen tritt bei Lys¹⁵ auf, wobei hier die Substitution einiger Aminosäuren auch zur totalen Reduzierung der Bindung führt. Bei Positionen wie Lys¹⁵ ist es schwierig, eine Aussage über die Wichtigkeit des Aminosäurerestes für die Bindung zum Rezeptor zu machen, da an dieser Position die Toleranz gegenüber den substituierten Aminosäuren breit gefächert ist. Die Zuordnung der Wichtigkeitsstufen für Lys¹⁵ kann nicht eindeutig erfolgen und somit sollte die Relevanz dieser Aminosäure und derer, die sich ähnlich verhalten, stets kritisch betrachtet werden.

In der hier angefertigten Substitutionsanalyse treten im Gegensatz zu dem Alanin-Scan von Nicole *et al.* (Nicole *et al.*, 2000a) deutliche Unterschiede auf. Das kann daran liegen, daß Nicole *et al.* eine andere Methode verwendet haben, um das Verhalten der VIP-Derivate am Rezeptor zu untersuchen. Während bei Nicole *et al.* die Bindung der Alanin-substituierten VIP-Derivate aufgrund der Fähigkeit, ¹²⁵I-VIP zu verdrängen, bestimmt wurde, sind in der vorliegenden Arbeit die Bindung der VIP-Derivate mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht worden.

Überdies wurde die Bindung der Alanin-substituierten VIP-Derivate von Nicole *et al.* an Membranpräparationen getestet, während die vollständige Substitutionsanalyse an einem System mit ganzen lebenden VPAC₁-überexprimierenden RIN38-Zellen durchgeführt wurde, die zusätzlich mit eGFP koexprimiert wurden. Des weiteren muß berücksichtigt werden, daß für die Substitutionsanalyse VIP-Derivate verwendet wurden, welche mittels Spotsynthese hergestellt wurden. Nicole *et al.* dagegen haben für ihre Untersuchungen gereinigte Derivate benutzt, die im präparativen Maßstab synthetisiert wurden. Die Verdrängung eines Radioliganden mit einem nicht markierten Liganden bietet natürlich die Möglichkeit, die Spezifität des Liganden zu

ermitteln. Diese Methode ist aber relativ aufwendig, da für die Bestimmung einer K_i eine Vielzahl verschiedener Ligandenkonzentrationen für die Verdrängung erprobt werden müssen. Bei der FACS-Analyse wird die gesamte Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen. Das heißt also, daß die totale Bindung der fluorsceszenzmarkierten Peptide und deren Internalisierung ermittelt wird, wobei hier nicht unterschieden werden kann, ob es sich dabei um spezifische oder unspezifische Bindung handelt. Diese Technik findet im Screening ihren Einsatz, da die Zellbindung einer großen Anzahl verschiedener Peptid-Konjugate sehr einfach und schnell gemessen werden kann. Die Koexpression von eGFP sollte keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten von Liganden haben. Da eGFP an das C-terminale Ende des Rezeptors exprimiert wurde, könnten allenfalls Auswirkungen auf die Signalkette des Rezeptors oder auf Phosphorylierungen innerhalb der Zelle entstehen. Den größten Einfluß auf das Bindungsverhalten der VIP-Derivate zu VPAC₁ hat sicherlich das N-terminal gekoppelte Farbstoffmolekül.

Es konnte gezeigt werden, daß Differenzen zwischen dem Alanin-Scan von Nicole *et al.* (Nicole *et al.*, 2000a) und unserer VIP-Substitutionsanalyse bestehen. Der Hauptteil der Ergebnisse beider Studien korreliert allerdings sehr gut miteinander, insbesondere bei der Bestimmung der Schlüsselaminosäuren.

Für die Verifizierung der Substitutionsanalyse wurden 30 unterschiedliche N-terminal mit Cy5 markierte VIP-Derivate präparativ nachsynthetisiert und ebenfalls am FACS-Gerät gemessen (Abb. 5.12). Hierbei konnte die Mehrzahl der nachsynthetisierten Derivate die Ergebnisse der Substitutionsanalyse bestätigen. Einige Derivate jedoch zeigten bei der Verifizierung ein anderes Bindungsverhalten. Diese Abweichungen treten bei Aminosäuren auf, welche bei der Messung der Substitutionsanalyse eine sehr hohe Bindung aufwiesen und die bei der Verifikation teilweise eine wesentlich schwächere Bindung zu VPAC₁ zeigten. Dieses Verhalten kann wahrscheinlich auf die Qualitätsunterschiede der VIP-Derivate zurückgeführt werden. Es wird angenommen, daß die bindenden VIP-Derivate aufgrund ihrer Verunreinigungen eine stark erhöhte unspezifische Bindung hervorrufen. Konjugate, die in der Substitutionsanalyse wenig oder fast gar nicht gebunden haben, zeigten bei der Verifizierung ein ähnliches Verhalten. Die Kombination von Spotsynthese und FACS-Analyse sollte nur im Vorfeld für den Einsatz in Screeningexperimenten genutzt werden. Für Untersuchungen zur eingehenden Charakterisierung einzelner Peptid-Derivate sollte auf jeden Fall auf gereinigte Peptide zurückgegriffen werden.

In der Substitutionsanalyse wurde das Farbstoffmolekül an das N-terminale Ende der VIP-Derivate an His¹ gekoppelt. Die Ergebnisse der Substitutionsanalyse haben allerdings gezeigt,

daß His¹ für die Bindung von VIP an VPAC₁-überexprimierende Zellen nicht ganz unerheblich ist. Aus diesem Grund wurde die Position des Farbstoffes in der VIP-Sequenz variiert, indem der Farbstoff jeweils an jede Position der VIP-Sequenz gekoppelt wurde. Mit Hilfe dieses Farbstoff-Walkes (Abb. 5.13) konnte herausgefunden werden, daß fast sämtliche Aminosäurepositionen des Peptids besser für die Markierung mit dem Farbstoffmolekül geeignet sind als His¹. Vor allem die Positionen 5, 8, 9 und 16 zeigten sich für diese Zwecke gegenüber der Bindung an VPAC₁-überexprimierende Zellen sehr vorteilhaft. Diese Ergebnisse werden auch mit der hier angefertigten Substitutionsanalyse bestätigt, da dort diese Positionen als unwichtig definiert wurden.

Basierend auf den Ergebnissen der Substitutionsanalyse wurde ein VIP-Supermotiv (Abb. 5.11) erstellt. Mit Hilfe dieses Supermotivs kann man sehr schnell und leicht erkennen, wo sich die entscheidenden Schlüsselaminosäuren und die eher unwichtigen Aminosäuren in der VIP-Sequenz befinden. Das Supermotiv kann für das rationelle Design modifizierter VIP-Derivate hinsichtlich einer Stabilisierung genutzt werden, indem die X-Positionen gegen stabilere Substanzen wie zum Beispiel unnatürliche Aminosäuren oder d-Aminosäuren ersetzt werden. Weiterhin dient das Supermotiv dazu, die Positionen zu bestimmen, an welche das Farbstoffmolekül gekoppelt werden kann. Die Ergebnisse der Substitutionsanalyse bieten die Möglichkeit, gezielte Modifikationen der VIP-Sequenz durchzuführen. So wäre es denkbar, daß an Positionen, bei denen in der Sequenz der nativen Aminosäuren nur physikochemisch verwandte Aminosäuren zugelassen sind, Bausteine mit entsprechenden Strukturen und Funktionen einzusetzen. Zum Beispiel könnte bei der Position Tyr²², welche zusätzlich nur Phenylalanin oder Tryptophan toleriert, mit den Aromaten Naphtalalanin oder Cyclohexylalanin substituiert werden. Val¹⁹ kann nur durch aliphatische Aminosäuren ersetzt werden, so daß eine Stabilisierung des Peptids an dieser Stelle möglicherweise auch mittels Substitution mit Norleucin, Norvalin oder β -Alanin erreicht werden könnte. Die vielen positiv geladenen Aminosäuren in der VIP-Sequenz könnten beispielsweise mit den ebenfalls positiv geladenen Substanzen Citrullin oder Ornithin substituiert werden. Weiterhin wäre es ebenfalls möglich, mit Hilfe nicht-peptidischer Verbindungen stabile VIP-Mimetika herzustellen. So haben zum Beispiel Olson *et al.* Ansätze getestet, bei denen durch den Einbau trizyklischer Ringsysteme wie Phenothiazine oder Dibenzazepine mehrere nicht essentielle Aminosäuren parallel substituiert wurden (Olson *et al.*, 1993). Die nicht-peptidische Substanz fungierte hier als eine Art Abstandhalter zwischen die wichtigen Aminosäurepositionen in der Helix. Mit diesem VIP-Derivat wurde jedoch nur 10 % der Bindung des nativen VIP erreicht, so daß ein weiterer Bedarf an Optimierung besteht.

6.2 *In vitro* Charakterisierung von VIP- und [Arg⁸]-VIP-Konjugaten

Bei der Substitutionsanalyse konnten gegenüber dem Alanin-Scan (Nicole *et al.*, 2000a) vor allem bei der Position 8 starke Abweichungen gezeigt werden. Während mit Hilfe des Alanin-Scans dem Asn⁸ eine essentielle Bedeutung zugesprochen wurde, konnte in der hier angefertigten Substitutionsanalyse mit fast jeder Aminosäure an dieser Stelle substituiert werden. Diese Position scheint für die Funktion und die Strukturbildung nicht wichtig zu sein. Zur Überprüfung wurde das [Arg⁸]-VIP-Cy5(1)-Analogon synthetisiert. Dieses VIP-Analogon präsentiert an der Position 8 statt der negativ geladenen Asparaginsäure des Wildtyps eine positive Ladung. [Arg⁸]-VIP-Cy5 hat innerhalb der Substitutionsanalyse eine sehr hohe Bindung an RIN38(VPAC₁)-Zellen gezeigt. In einem Verdrängungsassay wurde die Bindung weiter quantifiziert und auf Spezifität getestet. Aus den Ergebnissen (Tab. 5.3) wurde ersichtlich, daß die gemessenen Konjugate eine spezifische Bindung zum VPAC₁-Rezeptor aufweisen. Die Bindungsaffinität der farbstoffmarkierten VIP-Derivate ist im Vergleich zu unmarkiertem VIP generell vermindert. Während N-terminal markiertes natives VIP die schlechteste Bindung aufweist, bewirkt die Substitution einzelner Positionen mit Arginin oder Tryptophan jeweils einen Affinitätsgewinn. Diese Affinitätssteigerung kann damit zusammenhängen, daß wie oben schon besprochen, positive Ladungen des VIP aufgrund der Anziehungskräfte zu negativ geladenen Aminosäuren der putativen Bindungstasche des Rezeptors die Rezeptorbindung begünstigen. Das Einbringen von Tryptophan kann die Interaktion mit den 3 Aromaten der Rezeptorbindungstasche unterstützen. Zusätzlich wurden weitere Farbstoffpositionen für das native VIP und das [Arg⁸]-Analogon in radioaktiven Kompetitionsstudien untersucht. Von den 3 getesteten Positionen des Farbstoffes zeigte sich, daß jede Position besser für die Farbstoffkopplung geeignet scheint, als der N-Terminus (Tab. 5.3). Für die native VIP-Sequenz ist die Position 16 für den Farbstoff am besten angebracht, hier konnte eine IC₅₀ im höher affinen Bereich (IC₅₀ = 45 nm) gemessen werden. Der Grund für diese unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten kann auf Basis dieser Arbeit nicht hinreichend erklärt werden. Hierzu wären weiterführende strukturelle Untersuchungen nötig. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Position auch für andere Modifikationen gut zugänglich ist. Gestützt wird dies auch durch Arbeiten von Gourlet *et al.*, die ein VIP-Analogon entwickelt haben, bei der Position 16 mit Arginin ausgetauscht wurde (Gourlet *et al.*, 1996). Die Autoren berichten über eine 4fach höhere Bindung des VIP-Analogon an VPAC₁ und eine 3fach höhere Produktion von cAMP. Wir konnten diese Steigerung durch die Substitution von Arginin an Position 16 mit Hilfe der Substitutionsanalyse bestätigen. Das [Arg¹⁶]-VIP ist somit eine interessante Zielstruktur für die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes und der Testung für

diagnostische Zwecke. Da sich in dieser Studie die Position 16 als die bisher beste Position für die Kopplung des Farbstoffmoleküls herausgestellt hat, böte es sich an, eine Substitutionsanalyse des VIP-Cy5(16)-Derivates anzufertigen. Dies konnte in dieser Studie allerdings wegen Zeitmangel nicht durchgeführt werden.

Die Untersuchungen der antagonistischen bzw. agonistischen Funktion der VIP-Farbstoff-Konjugate im cAMP-Assay haben ergeben, daß die Affinitäten und biologischen Aktivitäten weitgehend korrelieren (Abb. 5.21). Derivate, welche eine höhere Affinität zum VPAC₁ aufwiesen wie zum Beispiel VIP-Cy5(16), haben im cAMP-Assay ebenfalls eine höhere cAMP-Produktion induziert. N-terminal markiertes Wildtyp-VIP-Konjugat, welches eine sehr niedrige Affinität zum Rezeptor zeigte, hat auch einen sehr geringen Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen hervorgerufen.

Während die Position des Farbstoffmoleküls in der VIP-Sequenz starke Auswirkungen auf die Rezeptoraffinität und biologische Funktion hat, bleibt die metabolische Stabilität der VIP-Derivate davon überwiegend unabhängig (Abb. 5.24 und Abb. 5.25). Die strukturelle Modifikation des VIP durch die Substitution von Asn⁸ mit Arginin jedoch führte zu einer merklichen Verzögerung des proteolytischen Abbauprozesses. Daher wird angenommen, daß das native VIP-Farbstoff-Derivat genau an der Position 8 proteolytisch gespalten oder die native Aminosäure Asn⁸ an einer Erkennungsequenz für Proteasen beteiligt ist, so daß die Degradation an dieser Stelle verzögert oder verhindert wird. In der Literatur wurde die Frage, zwischen welchen Aminosäuren VIP gespalten wird, bislang nicht zufriedenstellend bearbeitet. Einen Zusammenhang zwischen der Stabilität mit der Rezeptoraffinität kann man ausschließen, da das VIP-Derivat VIP-Cy5(16) mit der höchsten Affinität nicht am längsten stabil bleibt. Bolin *et al.* haben in Stabilitätsuntersuchungen von VIP zwei Spaltstellen identifiziert (Bolin *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, daß die Amidbindung zwischen Ser²⁵ und Ile²⁶ und die Bindung zwischen Thr⁷ und Asp⁸ gespalten wird. Es wäre somit durchaus möglich, daß die Modifikation an Position 8 Veränderungen hinsichtlich der Stabilität hervorrufen kann. Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, daß die Degradation von Peptiden häufig an Aspartyl- und Asparaginylnresten erfolgt (Nabuchi *et al.*, 1997, Bongers *et al.*, 1992). Es wird angenommen, daß die Degradation an dieser Stelle über Deaminierung, Isomerisierung und Racemisierung dieser Aminosäurereste geschieht, wobei ein zyklisches Imid als Zwischenprodukt fungiert. Im Fall des VIP würde sich dieses Imid aus der Carboxylgruppe der Asparaginsäure und der Aminogruppe des Peptidrückgrates bilden und so die Peptidbindung aufbrechen. Es sei angemerkt, daß neben der hier gewählten Methode für eine genauere Bestimmung der Stabilität von Peptidderivaten zusätzlich Untersuchungen der Stabilität in Plasma durchgeführt werden sollten. Dennoch ist ein

Vergleich der Substanzen und eine Auswahl möglichst stabiler Derivate auf dieser Basis möglich.

6.3 *In vivo* Imaging von [Arg⁸]-VIP-Cy7(1)

Die spezifische Anreicherung farbstoffmarkierter VIP-Derivate in Tumoren wurde mit Hilfe der *in vivo* Fluoreszenzbildgebung im Tiermodell untersucht. Licha *et al.* konnten zeigen, daß einige Cyaninfarbstoffe auch ohne einen gekoppelten spezifischen Liganden im Tumor angereichert werden können (Licha *et al.*, 2000b). Ein annehmbarer Kontrast mit den hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen wurde jedoch erst 6 – 24 Stunden nach Injektion erreicht. Aufgrund der höheren Eindringtiefe von NIR-Licht im Gewebe wurde der in anderen Experimenten verwendete Cy5-Farbstoff durch Cy7 ersetzt.

Bei den hier durchgeführten Imaging-Experimenten wurden 12 Nacktmäuse mit VPAC₁-überexprimierenden Tumoren in 3 Gruppen unterteilt, wobei eine Gruppe das Analogon [Arg⁸]-VIP-Cy7(1), eine Gruppe Wildtyp-VIP-Cy7(1) und die letzte Gruppe „scrambled“ VIP-Cy7(1) verabreicht bekam (Abb. 5.28, 5.29 und 5.30). Bei allen Tieren ist auffällig, daß im Bereich der Lunge, Bauchraum und Nieren ein Fluoreszenzsignal zu sehen ist. Dieses Phänomen ist darauf zurückzuführen, daß auch im Normalgewebe von zum Beispiel Lunge, Gastrointestinaltrakt, Leber etc. VPAC₁-Rezeptoren exprimiert werden (Reubi *et al.*, 2000). Das Signal in den Nieren kommt aufgrund der renalen Ausscheidung der Peptidliganden zustande.

Die Applikation des scr VIP-Cy7(1) verursachte wie erwartet kein spezifisches Fluoreszenzsignal im Tumor. Bei der Applikation des wt VIP-Cy7(1)-Derivates dagegen war eine schnelle Akkumulation des Liganden im Tumor zu sehen, welche zum Zeitpunkt 5 min. nach Applikation das Maximum erreicht hatte. Dies zeigt, daß VIP gekoppelt mit dem Carbocyaninfarbstoff gut für die Bildgebung der VPAC₁-überexprimierenden Tumore verwendet werden kann. Der Kontrast zwischen dem Fluoreszenzsignal im Tumor und dem Signal im normalen Gewebe ist gut sichtbar. Die Kontrastverläufe demonstrieren, daß das native VIP-Konjugat *in vivo* nicht stabil ist (Abb. 5.31). Im Gegensatz dazu akkumuliert [Arg⁸]-VIP-Cy7(1) langsamer im Tumor und erreicht erst zum Zeitpunkt 30 min. nach Applikation ein Kontrastmaximum, welches jedoch deutlich höher ist als beim wt VIP-Cy7(1) (Abb. 5.32). [Arg⁸]-VIP-Cy7(1) wird somit weniger schnell ausgeschieden und hat eine höhere Halbwertszeit im Tiermodell. Diese erhöhte Stabilität ist auf die Substitution der Position 8 mit Arginin aus den schon oben genannten Gründen zurückzuführen. Es wird angenommen, daß aufgrund der höheren Stabilität gegenüber

proteolytischen Abbauprozessen dieses VIP-Derivat vermutlich länger im Blutkreislauf zirkulieren kann und auf diese Weise auch quantitativ mehr Substanz zum Tumor gelangt, welches das höhere Fluoreszenzsignal erklärt. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in Rattenleberextrakt und die *in vivo* Imaging-Versuche korrelieren sehr gut miteinander. In beiden Versuchen konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, daß eine einzige Modifikation in der VIP-Sequenz (Asp⁸ → Arg⁸) eine höhere Stabilität gegenüber proteolytischen Degradationen bewirkt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei Applikation desselben VIP-Konjugates in verschiedene Mäuse werden mit verschiedenen Parametern der Tumore in Zusammenhang gebracht. Zum einen ist das Stadium der Nekrose des Tumorgewebes für die Anreicherung von markierten Peptidliganden von großer Bedeutung, zum anderen ist auch die Versorgung der Tumore über Gefäße, also die Gefäßdichte und Durchlässigkeit, sehr wichtig. In diesem Projekt wurden die Tumore durch Inokulation von RIN38(VPAC₁)-Zellen unter die Bauchdecke der Mäuse erzeugt. Folglich wurden die Imaging-Versuche mit Tumoren durchgeführt, welche sehr schnell gewachsen sind und auch relativ früh nekrotisieren. Die Versorgung der Tumore mit Peptidliganden ist bei hochnekrotisiertem Gewebe nicht gewährleistet. Für die Untersuchung dieser Eigenschaften wären histologische Untersuchungen des Tumorgewebes notwendig, welche im Rahmen dieser Studie jedoch nicht durchgeführt wurden. Um das Problem der Nekrose zu umgehen, kann möglicherweise die Untersuchung der markierten VIP-Derivate mit langsam wachsenden Tumoren, die sich spontan gebildet haben und keine oder nur eine geringfügige Nekrose aufweisen zu geringeren Fehlerquoten innerhalb der Tierversuchsgruppen führen.

Der Vorteil der VIP-Farbstoff-Derivate ist im Gegensatz zu früheren Bildgebungsstrategien (Folli *et al.*, 1994; Ballou *et al.*, 1995; Weissleder *et al.*, 1999) das schnelle Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität des Tumors innerhalb einer Stunde. Dieser Aspekt ist vor allem für die diagnostischen Zwecke in der Klinik günstig. Im Unterschied dazu hat sich bei der Kopplung von Carbocyaninfarbstoffen an monoklonale Antikörper die hohe Plasmahalbwertszeit der Antikörper als großer Nachteil ausgewirkt, da so ein hohes Hintergrundrauschen der Fluoreszenz erzeugt wurde.

Die Expression von VPAC₁-Rezeptoren in gesundem Gewebe verschiedener Organe begrenzen den Einsatz markierter VIP-Derivate in der Tumordiagnostik. Die eindeutige Beurteilung eines Tumors kann nur dort erfolgen, wo im umliegenden Gewebe eine relativ niedrige Rezeptorzahl vorhanden ist, so daß ein ausreichender Kontrast entstehen kann. VIP gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen kann aufgrund der geringeren Eindringtiefe des NIR-Lichtes nur für die

Bildgebung oberflächlicher Tumore, die mittels endoskopischer Detektion diagnostiziert werden können, verwendet werden. Deshalb sind VPAC₁-exprimierende Tumore wie zum Beispiel die des Pankreas, welcher der Endoskopie nicht zugänglich ist, von diesem Diagnoseverfahren ausgeschlossen. Adenokarzinome im Kolon scheinen aufgrund eines hohen Kontrastes zwischen VPAC₁-Expression in Tumor- und Normalgewebe (Reubi *et al.*, 1999, Wiedenmann *et al.*, 1998) und der Möglichkeit der Verwendung endoskopischer Methoden besonders für die Verwendung markierter VIP-Derivate geeignet zu sein. Aber auch Tumore in der Blase, Speiseröhre und Lunge können hierfür in Betracht gezogen werden.

7. Ausblick

Die Ergebnisse der vollständigen Substitutionsanalyse von VIP bietet mehrere Ansätze, verschiedene VIP-Analoga unter Erhalt der Bindungseigenschaften zu entwickeln. Mit Hilfe der Substitutionsanalyse von VIP konnten zahlreiche farbstoffmarkierte VIP-Derivate wie zum Beispiel [Arg⁸]-VIP, [Arg¹⁶]-VIP und [Trp²]-VIP identifiziert werden, welche gegenüber dem nativen VIP-Cy5-Konjugat eine höhere Bindung zu VPAC₁-überexprimierten Zellen zeigten. Für eine weitere Optimierung dieser Analoga wären zusätzliche Substitutionsanalysen notwendig. Ferner ist die Position des Farbstoffmoleküls von entscheidender Bedeutung, so daß es bei den verschiedenen VIP-Konjugaten unerlässlich ist, die optimale Farbstoffposition mit einem Farbstoffwalk zu ermitteln.

Die Ergebnisse der Substitutionsanalyse können außerdem für die gezielte Steigerung der Stabilität des VIP genutzt werden. Die Stabilisierung kann über die Substitution von für die Rezeptorbindung nicht essentiellen Aminosäuren mit nichtpeptidischen Verbindungen, unnatürlichen Aminosäuren oder D-Aminosäuren erfolgen. Weiterhin ist auch denkbar, über Cystein oder Homocystein Zyklisierungen in die VIP-Sequenz einzufügen. Derartige Zyklisierungen konnten von Xia et al. am Beispiel von Ro 25-1392, einem zyklisierten VIP-Analogon für VPAC₂, erfolgreich eingesetzt werden. Auch bei der Entwicklung des Somatostatin-Derivates Oktreotid wurde der Ligand zyklisiert (Rosenberg, 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde das VIP-Analogon [Arg⁸]-VIP detaillierten *in vitro* Tests unterzogen. Bei der Untersuchung der metabolischen Stabilität in Rattenleberextrakt hat [Arg⁸]-VIP-Cy5 eine erhöhte Stabilität gegenüber dem nativen VIP-Cy5-Derivat gezeigt. Diese erhöhte Stabilität konnte weiterhin mit einer höheren Halbwertszeit des Analogons im *in vivo* Imaging mit Mäusen bestätigt werden. Es ist jedoch nicht geklärt, wie sich dieses Analogon auf der Oberfläche der Tumorzellen verhält. Demgemäß sollte untersucht werden, ob der Ligand außen auf der Zelloberfläche bleibt oder mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose internalisiert wird.

Für die *in vivo* Imaging-Experimente in dieser Studie wurden Mäuse mit inokulierten Tumoren verwendet. Um eine Untersuchung der Fluoreszenzbildgebung unter realistischeren Bedingungen durchzuführen, sollten zusätzlich Experimente mit Tieren, die spontan selbst Tumore entwickeln, in Betracht gezogen werden. Im Fall der Weiterentwicklung der VIP-Derivate sollte weiterhin die Toxizität der Substanzen überprüft werden, da toxische Nebeneffekte der farbstoffmarkierten VIP-Derivate nicht ausgeschlossen werden können.

8. Literaturverzeichnis

1. Abagyan, R.A., Totrov, M., Kutznetsov, D.N. (1994): ICM – a new method for protein modeling and design. Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation, *J. Comp. Phys.* *151*: 402-421
2. Ballou, B., Fisher, G.W., Waggoner, A.S., Farkas, D.L., Reiland, J.M., Jaffe, R., Mujumdar, R.B., Mujumdar, S.R., Hakala, T.R. (1995): Tumor labeling in vivo using cyanine-conjugated monoclonal antibodies, *Cancer Immunol. Immunother.* *41*: 257-263
3. Ballou, B., Fisher, G.W., Hakala, T.R., Farkas, D.L. (1997): Tumor detection and visualization using cyanine fluorochrome-labeled antibodies, *Biotechnol. Prog.* *13*: 649-658
4. Beaudet, A., Nouel, D., Stroh, T., Vandenbulcke, F., Dal-Farra, C., Vincent, J.-P. (1998): Fluorescent ligands for studying neuropeptide receptors by confocal microscopy, *Braz. J. Med. Biol. Res.* *31*: 1479-1489
5. Becker, A., Riefke, B., Ebert, B., Sukowski, U., Rinneberg, H., Semmler, W., Licha, K. (2000): Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin, *Photochem. Photobiol.* *72*: 234-241
6. Becker, A., Hessenius, C., Licha, K., Ebert, B., Sukowski, U., Semmler, W., Wiedenmann B., Grötzinger, C. (2001): Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands, *Nat. Biotechnol.* *19*: 327-331
7. Blaber, M., Zhang, X., Matthews, B.W. (1993): Structural basis of amino acid α helix propensity, *Science* *260*: 1637-1639
8. Bodanszky, M., Klausner, Y.S., Said, S. (1973): Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasocative intestinal peptide, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* *70*: 382-384

9. Bolin, D.R., Michalewsky, J., Wasserman, M.A., O'Donnell, M. (1995): Design and development of a vasoactive intestinal peptide analog as a novel therapeutic for bronchial asthma, *Biopolymers* 37: 57-66
10. Bongers J., Heimer E.P., Lambros T., Pan Y.C., Campbell R.M., Felix A.M. (1992): Degradation of aspartic acid and asparagine residues in human growth hormone-releasing factor, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 39: 364-74
11. Carter, P.H., Resto-Ruiz, S., Washington, G.C., Ethridge, S., Palini, A., Vogt, R., Waxdal, M., Fleisher, T., Noguchi, P.D., Marti, G.E. (1992): Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations, *Cytometry* 13: 68-74
12. Chadker, S., Rattan, S. (1993): The entire vasoactive intestinal polypeptide molecule is required for the activation of the vasoactive intestinal polypeptide receptor: Functional and binding studies in opossum internal anal sphincter smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 266: 392-399
13. Cheng, Y.C., Prusoff, W. (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108
14. Couvineau, A., Amiranoff, B., Vauclin-Jacques, N., Laburthe, M. (1984): Structural requirements for VIP interaction with specific receptors in human and rat intestinal membranes: effect of nine partial sequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 493-498
15. Couvineau, A., Rousset, M., Laburthe, M. (1985): Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29, *Biochem.* 231: 139-143
16. Couvineau, A., Fabre, C., Gaudin, P., Maoret, J.J., Laburthe, M. (1996a): Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human VIP 1 receptor, *Ann. N Y Acad. Sci.* 805: 558-562
17. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Maoret, J.J., Gaudin, P., Nicole, P., Laburthe, M. (1996):

Vasoactive intestinal peptide (VIP)1 receptor, *J. Biol. Chem.* 271: 12795-12800

- Di Cera, E. (1998): Site-specific thermodynamics: Understanding cooperativity in molecular recognition, *Chem. Rev.* 98: 1563-1591
18. Dickinson, T., Fleetwood-Walker, S.M. (1999) VIP and PACAP; very important in pain? *TiPS* 20: 324-329
19. Dickson, E.F., Holmes, H., Jori, G., Kennedy, J.C., Nadeau, P., Pottier, R.H., Rossi, F., Russell, D.A., Weagle, G.E. (1995): On the source of the oscillations observed during in vivo zinc phthalocyanine fluorescence pharmacokinetic measurements in mice, *Photochem. Photobiol.* 61: 506-509
20. Domschke, S., Domschke, W., Bloom, S.R., Mitznegg, P., Mitchell, S.J., Lux, G., Strunz, U. (1978): Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects, *Gut* 19: 1049-1053
21. Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., Moan, J., Peng, Q. (1998): Review: Photodynamic therapy, *J. Nat. Cancer Inst.* 17: 889-905
22. Follis, S., Westermann, P., Braichotte, D., Pelegrin, A., Wagnieres, G., van den Bergh, H., Mach, J.P. (1994): Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice, *Cancer Res.* 15: 2643-2649
23. Frank, R. (1992): Spot synthesis: an easy technique for the positionally adressable, parallel chemical synthesis on a membrane support, *Tetrahedron* 48: 9217-9232
24. Frishman, D., Argos, P. (1996): Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence, *Protein Eng.* 9: 133-142
25. Fry, D.C., Madison, V. S., Bolin, D.R., Greeley, D.N., Toome, V., Wegrzynski, B.B. (1989): Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics, *Biochem.* 28: 2399-2409

27. Gaudin, P., Couvineau, A., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C., Laburthe, M. (1996): Establishment of a CHO cell clone stably expressing the recombinant human VIP-1 receptor, *Ann. N Y Acad. Sci.* 805: 570-573
28. Gaudin, P., Maoret, J.J., Couvineau, a., Rouyer-Fessard, C., Laburthe, M. (1998): Constitutive activation of the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor, a member of the new class II family of G protein-coupled receptor, *J. Biol. Chem.* 273: 4990-4996
29. Goldsmith, S.J. (1997): Receptor imaging: competitive or complementary to antibody imaging?, *Semin. Nucl. Med.* 27: 85-93
30. Goossens, J.-F., Cotellet, P., Chavatte, P., Hénichart, J.-P. (1996): NMR Study of five N-terminal peptide fragments of the vasoactive intestinal peptide : Crucial role of aromatic residues, *Peptide Research* 9: 322-326
31. Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.-C., De Neef, P., Waelbroek, M., Robberecht, P. (1996) : Effect of introduction of an Arginine16 in VIP, PACAP and secretin on ligand affinity for the receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1314: 267-273
32. Gourlet, P., Vandermeers, A., Vertongen, P., Rathe, J., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroek, M., Robberecht, P. (1997): Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists, *Peptides* 18: 1539-1545
33. Gozes, I., Fridkin, M., Hill, J.M., Brennemann, D.E. (1999a): Pharmaceutical VIP: Prospects and problems, *Curr. Med. Chem.* 6: 1019-1034
34. Gozes, I., Perl, O., Giladi, E., Davidson, A., Ashur-Fabian, O., Rubintraut, S., Fridkin, M. (1999b): Mapping the active site in vasoactive intestinal peptide to a core of four amino acids: Neuroprotective drug design, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4143-4148
35. Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Spreadharan, S.P., Wank, S.A., Waschek, J.A. (1998):

International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and adenylate cyclase-activating polypeptide, *Pharmacological Rev.* 50: 265-270

36. Heppeler, A., Froidevaux, S., Eberle, A.N., Maecke, H.R. (2000): Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides, *Curr. Med. Chem.* 7: 971-994
37. Hassenius, C., Bäder, M., Böhmig, M., Faiss, S., Reubi, J.C., Meinhold, H., Wiedenmann, B. (2000): Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumors, *Eur. J. Nucl. Med.* 27, 1684-1693
38. Hofstee B.H.J. (1952): On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions, *Science* 116: 329-331
39. Holtmann, M.H., Hadac, E.M., Miller, L.J. (1995): Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors, *J. Biol. Chem.* 270: 14394-14398
40. Holst, B., Zoffmann, S., Elling, C.E., Hjorth, S.A., Schwartz, T.W. (1998): Steric hindrance mutagenesis versus alanine scan in mapping of ligand binding sites in the tachykinin N1 receptor, *Mol. Pharmacol.* 53: 166-175
41. Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., Nagata, S. (1992): Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide, *Neuron* 8: 811-819
42. Jensen, R.T., Gibril, F., Termanini, B. (1997): Definition of the role of somatostatin receptor scintigraphy in gastrointestinal neuroendocrine tumor localization, *Yale J. Biol. Med.* 70: 481-500
43. Keltz, T.N., Straus, E., Yalow, R.S. (1980): Degradation of vasoactive intestinal polypeptide by tissue homogenates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 669-674
44. Kendall, J.M., Badminton, M.N. (1998): *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an

exciting new era, *TIBTECH 16*: 216-224

45. Kramer, A., Keitel, T., Winkler, K., Stöcklein, W., Höhne, W., Schneider-Mergener, J. (1997): Molecular basis for the binding promiscuity of an Anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody, *Cell 91*: 799-809
46. Laburthe, M., Rousset, M., Boissard, C., Chevalier, G., Zweibaum, A., Rosselin, G. (1978): Vasoactive intestinal peptide : A potent stimulator of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75*: 2772-2775
47. Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J.J., Royer-Fessard, C., Nicole, P. (1996): Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1 and other members of their new family of G protein linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor, *Ann. N. Y. Acad. Sci. 805*: 94-109
48. Lelièvre, V., Pineau, N., Du, J., Wen, C.-H., Nguyen, T., Janet, T., Muller, J.-M., Waschek, J.A. (1998): Differential effects of peptide histidine isoleucine (PHI) and related peptides on stimulation and suppression of neuroblastoma cell proliferation, *J. Biol. Chem. 273*: 19685-19690
49. Licha, K., Bhargava, S., Rheinländer, C., Becker, A., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R. (2000a): Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes, *Tetrahedron Letters 41*: 1711-1715
50. Licha, K., Riefke, B., Ntziachristos, V., Becker, A., Chance, B., Semmler W. (2000b): Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization, *Photochem. Photobiol. 72*: 392-398
51. Licha, K., Becker, A., Hassenius, C., Bauer, M., Henklein, P., Wiedenmann, B., Semmler, W. (2001): Synthesis, characterization and biological properties of cyanine-labeled somatostatin analogues as receptor-targeted fluorescent probes, *Bioconjug. Chem. 12*: 44-50

52. Lins, L., Couvineau, A., Rouer-Fessard, C., Nicole, P., Maoret, J.J., Benhamed, M., Brasseur, R., Thomas, A., Laburthe, M. (2001): The human VPAC1 receptor; 3D model and mutagenesis of the N-terminal domain, *J. Biol. Chem.* *30*: 10153-10160

53. Luis, J., Muller, J.-M., Abadie, B., Martin, J.-M., Marvaldi, J., Pichon, J. (1986): Cycle of vasoactive intestinal peptide and its binding site in a human adenocarcinoma cell line (HT29), *Eur. J. Biochem.* *156*: 631-636

54. Lutz, E.M., Sheward, W.J., West, K.M., Morrow, J.A., Fink, G., Harmar, A.J. (1993): The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide, *FEBS Lett.* *334*: 3-8

55. Mahmood, U., Tung, C.-H., Bogdanov, A., Weissleder, R. (1999): Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection, *Radiology* *213*: 866-870

56. Maruno, K., Absood, A., Said, S. (1998): Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*: 14373-14378

57. Muller, J.-M., El Battari, A., Ah-Kye, E., Luis, J., Ducret, F., Pichon, J. (1985): Internalization of the vasoactive intestinal peptide (VIP) in a human adenocarcinoma cell line (HT29), *Eur. J. Biochem.* *152*: 107-114

58. Nabuchi Y., Fujiwara E., Kuboniwa H., Asoh Y., Ushio H. (1997): The stability and degradation pathway of recombinant human parathyroid hormone: deamidation of asparaginyl residue and peptide bond cleavage at aspartyl and asparaginyl residues, *Pharm. Res.* *14*: 1685-1690

59. Neri, D., Carnemolla, B., Nissim, A., Leprini, A., Querze, G., Balza, E., Pini, A., Tarli, L., Halin, C., Neri, P., Zardi, L., Winter, G. (1997): Targetting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform, *Nat. Biotechnol.* *15*: 1271-1275

60. Nicole, P., Du, K., Couvineau, A., Laburthe, M. (1998): Site-directed mutagenesis of human vasoactive intestinal peptide receptor subtypes VIP1 and VIP2 : Evidence for difference in the structure-function relationship, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 284: 744-750
61. Nicole, P., Lins, L., Rouyer-Fessard, C., Drouot, C., Fulcrand, P., Thomas, A., Couvineau, A., Martinez, J., Brasseur, R., Laburthe, M. (2000a): Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist, *J. Biol. Chem.* 275: 24003-24012
62. Nicole, P., Maoret, J.-J., Couvineau, A., Momany, F.A., Laburthe, M. (2000): Tryptophan 67 in the human VPAC1 receptor: Crucial role for VIP binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 654-659
63. Olsen, J.O., Pozderac, R.V., Hinkle, G., Hill, T., O'Dorisio, T.M., Schirmer, W.J., Ellison, E.C., O'Dorisio M.S. (1995) : Somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors with indium-111 pentetreotide (Octreoscan), *Semin. Nucl. Med.* 25: 251-61
64. Olson, G.L., Bolin, D., Bonner, M.P., Bös, M., Cook, C.M., Fry, D.C., Graves, B.J., Hatada, M., Hill, D.E., Kahn, M., Madison, V.S., Rusiecki, V., Sarabu, R., Sepinwall, J., Vincent, G.P., Voss, M.E. (1993): Perspective: Concepts and progress in the development of peptide mimetics, *J. Med. Chem.* 36: 3039-3049
65. Pallela, V.R., Thakur, M.L., Chakder, S., Rattan, S. (1999): 99mTc-labeled vasoactive intestinal peptide receptor agonist: Functional studies, *J. Nucl. Med.* 40: 352-360
66. Poitout, V., Olson, L.K., Robertson, R.P. (1996): Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential application, *Diabetes Metab.* 22: 7-14
67. Raderer, M., Kurtaran, A., Leimer, M., Angelberger, P., Niederle, B., Vierhapper, H., Vorbeck, F., Hejna, M.H.L., Scheithauer, W., Pidlich, J., Virgolini, I. (2000): Value of peptide receptor scintigraphy using 123I-vasoactive intestinal peptide and 111In-DPTA-D-Phe1-Octreotide in 194 carcinoid patients: Vienna University Experience, 1993 to 1998, *J. Clin. Oncol.* 18: 1331-1336

68. Reubi, J. C. (1995): In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging, *J. Nucl. Med.* 36: 1846-1853
69. Reubi, J. C., Waser, B., Schmassmann, A., Laissue, J. A. (1999): Receptor autoradiographic evaluation of cholecystikinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro-intestinal adenocarcinoma samples: Where are they really located?, *Int. J. Cancer* 81: 376-386
70. Reubi, J.-C., Läderach, U., Waser, B., Gebbers, J.-O., Robberecht, P., Laissue, J.A. (2000): Vasoactive intestinal peptide/pituitary cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin, *Cancer Res.* 60: 3105-3112
71. Riefke, B., Licha, K., Wemmler, W. (1997): Kontrastmittel für die optische Mammographie, *Radiologe* 37: 749-755
72. Rosenberg, J.M. (1988): Octreotide: a synthetic analog of somatostatin, *Drug. Intell. Clin. Pharm.* 22: 748-754
73. Said, S. I., Mutt, V. (1970): Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine, *Science* 169: 1217-1218
74. Said, S.I., Dickman, K. (1998): Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Peptides (Editor Said, I.S.,) 345-361, Marcel Dekker, New York
75. Scatchard, G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N Y Acad. Sci.* 51: 660-672
76. Schelté, P., Boeckler, C., Frisch, B., Schuber, F. (2000): Differential reactivity of maleimide and bromoacetyl functions with thiols: Application to the preparation of liposomal diepitope constructs, *Bioconjugate Chem.* 11: 118-123
77. Sheward, W.J., Lutz, E.M., Copp, A.J., Harmar, A.J. (1998): Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo, *Brain*

78. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J. (1993): Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 546-553
79. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Xia, M., Ichokawa, S., Goetzl, E.J. (1994): Human vasoactive intestinal peptide 1 receptors expressed by stable transfectants couple to two distinct signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 145-152
80. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J. (1995): Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 2939-2943
81. Stepp, H., Sroka, R. & Baumgartner, R. (1998): Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: basic principles, techniques and clinical experience, *Endoscopy* 30: 379-386
82. Thakur, M. L., Marcus, C. S., Saeed, S., Pallela, V., Minami, C., Diggles, L., Pham, H. L., Ahdoot, R., Kalinowski, E. A. (2000): 99mTc-labeled vasoactive intestinal peptide analog for rapid localization of tumors in humans, *J. Nuc. Med.* 41: 107-110
83. Theriault, Y., Boulanger, Y., St-Pierre, S. (1991): Structural determination of the vasoactive intestinal peptide by two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy, *Biopolymers* 31: 459-464
84. Ulrich II, C.D., Holtmann, M., Miller, L.J. (1998): Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: Members of a unique family of G-protein coupled receptors, *Gastroenterology* 114: 382-397
85. Usdin, T.B., Bonner, T.I., Mezey, E. (1994): Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions, *Endocrinology* 135: 2662-2680
86. Van Rampelbergh, J., Poloczek, P., Francoys, I., Delporte, C., Winand, J., Robberecht, P., Waelbroeck, M. (1997): The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide I (PACAP I)

- and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cell through interaction with different G proteins, *Biochim. Biophys. Acta.* 1357: 249-255
87. Vertongen, P., De Clerck, P., Fourmet, J.-C., Martelli, H., Hélardot, P., Devalck, C., Peeters, T., Sariban, E., Robberecht, P. (1997a): Comparison between vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide levels in neuroblastoma tumour tissues, *Neuropeptides* 31: 404-413
 88. Vertongen, P., Schiffmann, S.N., Gourlet, P., Robberecht, P. (1997b): Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain, *Peptides* 18: 1547-1554
 89. Virgolini, I., Raderer, M., Kurtaran, A., Angerberger, P., Yang, Q., Radosavljevic, M., Leimer, M., Kaserer, K., Li, S.R., Kornek, G., Hübsch, P., Niederle, B., Pidlich, J., Scheithauer, W., Valent, P. (1996): 123I-Vasoactive Intestinal Peptide receptor scanning: Update of imaging results in patients with adenocarcinomas and endocrine tumors of the gastrointestinal tract, *Med. Biol.* 23: 685-692
 90. Volkmer-Engert, R., Hoffmann, B., Schneider-Mergener, J. (1997): Stably attachment of the HMB-linker to continuous cellulose membranes for parallel solid phase spot syntheses, *Tetrahedron Lett.* 38: 1029-1032
 91. Wagnieres, G.A., Star, W.M., Wilson, B.C. (1998): In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications, *Photochem. Photobiol.* 68: 603-632
 92. Weissleder, R., Tung, C.-H., Mahmood, U., Bogdanov, A. (1999): In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nat. Biotechnol.* 17: 375-378
 93. Welton, A.F., Lad, P.M., Newby, A.C., Yamamura, H., Nicosia, S., Rodbell, M. (1977): Solubilization and separation of the glucagon receptor and adenylate cyclase in guanine nucleotide-sensitive states, *J. Biol. Chem.* 252: 5947-5950

94. Wiedenmann, B., John, M., Ahnert-Hilger, G., Riecken, E.-O. (1998): Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system, *J. Mol. Med.* 76: 637-647
95. Wray, V., Nokiara, K., Naruse, S. (1998): Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 865: 37-44
96. Wulff, B., Knudsen, S.M., Adelhorst, K., Fahrenkrug, J. (1997): The C-terminal part of VIP is important for receptor binding and activation, as evidenced by chimeric constructs of VIP/secretin, *FEBS* 413: 405-408
97. Xia, M., Sreedharan, S.P., Goetzl, E.J. (1996): Predominant expression of type II vasoactive intestinal peptide receptors by human T lymphoblastoma cells: transduction of both Ca^{2+} and cyclic AMP signals. *J. Clin. Immunol.* 16: 21-30
98. Xia, M., Sreedharan, S.P., Bolin, D., Gaufo, G.O., Goetzl, J. (1997): Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor, *J. Pharm. Exp. Therap.* 281: 629-633
99. Zia, H., Leyton, J., Casibang, M., Hau, V., Brennemann, D., Fridkin, M., Gozes, I., Moody, T.W. (2000): (N-Stearyl, norleucine¹⁷) VIP hybrid inhibits the growth of pancreatic cancer cell lines, *Life Sci.* 66: 379-387

9. Abkürzungsverzeichnis

<i>aq. bidest</i>	„ <i>aqua bidest</i> “
Boc	t-Butoxycarbonyl
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum alumin“)
CAPE	“cellulose-amino-hydroxypropyl ether”
cpm	Zählereignisse pro Minute („counts per minute“)
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEDQ	N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin
EDT	Ethandithiol
eGFP	“enhanced green fluorescent protein”
EtOH	Ethanol
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (“ fluorescence activated cell sorting”)
FSC	Vorwärtsstreuung (“forward scatter”)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GRF	“growth hormone releasing factor”
HATU	[O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat]
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N`-[4-butansulfonsäure]
HPLC	“high performance liquid chromatography”
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
MeOH	Methanol
min	Minute
NIR	Nahinfrarot
NMI	N-Methylimidazol
NMM	N-Methylmorpholin

NMP	N-Methylpyrrolidon
PACAP	Pituitary adenylate activating peptide
PBS	phosphatgepufferte Lösung, („phosphate buffered saline“)
Pfp	Pentafluorphenyl
PHI	Peptide Histidine Isoleucinamid
PHV	Peptide Histidine Valinamid
Pmc	Pentamethylchromansulphonyl
PyBop	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexa- fluorophosphat
SCC	Seitwärtsstreuung, („side scatter“)
scr	„scrambled“
TBTU	2(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VPAC	VIP- und PACAP-bindender Rezeptor
wt	Wildtyp
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“

Es wurde der Einbuchstabencode für Aminosäuren verwendet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 31.5.2001